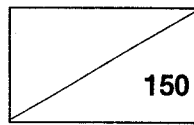


64/1
L293 ㄸ

GA0052-1016

최 종
연구보고서



19916653

첨단분석기법을 이용한 미량비타민의 분석 원료단백질의 식별 및 수입육의평가 시스템의 개발

Development of Systems for the Determination
of Trace Vitamins, the Speciation of Food
Proteins, and the Evaluation of Imported Meat
by Using Biospecific Methods

비타민 분석 단백질 분석

연구기관

한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “첨단분석기법을 이용한 미량비타민의 분석, 원료단백질의 식별 및 수입육의 평가시스템 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 손 동 화

연구 원 : 권 창 희

연구 원 : 김 순 미

연구 원 : 유 재 훈

연구 원 : 황 진 봉

연구 원 : 이 경 애

연구 원 : 윤 승 섭

연구 원 : 최 정 윤

연구 원 : 이 은 주

연구 원 : 이 향 범

연구 원 : 배 근 원

연구 원 : 김 성 실

연구 원 : 김 수 호

연구 원 : 곽 보 연

연구 원 : 음 병 옥

협동연구기관명 : 상지대학교

협동연구책임자 : 정 구 용

협동연구기관명 : 한동대학교

협동연구책임자 : 현 창 기

여 백

요 약 문

I. 제 목

첨단분석기법을 이용한 미량비타민의 분석, 원료단백질의 식별 및 수입육의 평가시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 목 적

종래 어렵거나 효율성이 낮은 분석의 문제를 해결하거나 보완할 수 있도록 생물특이반응 등을 이용한 다음의 첨단분석법을 개발함.

- ◇ 사료 및 식품중의 미량비타민 신분석법 개발
- ◇ 식품중 원료단백질 종류의 식별법 개발
- ◇ 육가공품 중 원료육의 판별법 개발
- ◇ 해동우육과 냉장우육을 구분할 수 있는 분석법 개발
- ◇ 방사선 조사육의 식별법 개발

2. 중요성

가. 식품이나 사료에 미량으로 존재하는 비타민의 분석법 (기기분석, Bioassay)은 검출감도가 낮거나, 전처리가 까다롭거나, 고도의 분석기술을 요하거나, 긴 시간을 요하는 문제가 있어 보완할 필요가 있다. 식품에 함

유된 미량비타민의 정확한 분석은 영양학적, 국민건강적 차원에서 매우 중요하며, 사료에 함유된 비타민의 분석은 사료의 효율을 증진시키는데 필수적이다.

나. 유제품, 육제품 등의 축산물이나 그 가공품에 사용된 원료단백질의 식별은 킬달정량, 유당분석, SDS-PAGE, 물성분석 등의 방법으로는 불가능하다. 또한, 육가공품중에 첨가제로 사용된 값싼 비육류 단백질인 대두, 우유, 계란, 밀 단백질의 함량분석이 국내에서 확립되어 있지 않아 그 분석방법의 도입이 필요하다. 육가공품이나 육가공품중에 표시된 원료를 사용하지 않거나 함량을 속이는 경우, 소비자의 경제적 피해를 초래하고 식품산업 발전을 저해하는 요인이 된다.

다. 최근 알레르기환자가 날로 증가하고 있으며, 식품성분중 특정 단백질이 원인이 되는 알레르기에 대응하여 그 원인물질(allergen)의 함유유무를 밝힐 수 있는 분석법이 확립되어야 알레르기환자의 식이를 조절할 수 있다. 주요 알레르겐으로서 대두, 계란, 우유를 들 수 있다.

라. 냉동육보다 육질이 우수한 냉장육의 유통을 정착시키기 위하여는 생산 및 유통 시스템의 확립과 아울러, 해동한 냉동육(수입품)을 값비싼 냉장육(국내산)과 구분할 수 있어야 한다.

마. 냉장 우육의 유통기한은 90일, 돈육은 50일이나 냉장육의 수출을 위해서는 위생적인 도축이나 방사선조사에 의한 살균이 필수적이며 일부국가에서는 허용되어 있다. 냉장육 수입이 자유화될 경우 유통기간을 연장하기 위해서 방사선 조사가 식육에도 적용될 수 있으므로 수입식육의 방사선 조사여부를 판별할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

바. 생물학적 특이성 등을 이용한 첨단분석방법을 개발하여 활용하면 분석의 효율화 및 간접적인 분석비용을 절감할 수 있다. 본 연구에서 개발하고자 하는 첨단분석방법은 아직 국내에서 초기 개발단계이어서 현장에서의 분석에 활용되지 못하고 있으므로 국가적인 차원에서 조속히 개발하여 활용할 필요가 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 내용

	미량비타민의 분석법 개발	비육류단백질 의 식별법 개발	원료육단백질 의 식별법 개발	수입육의 판별 및 분석기술 개발
ELISA	Biotin, Vit. D, Pantothenic acid	대두, 우유, 계란의 단백질	돼지, 닭, 소의 육단백질	우육 Myosin (변성도)
EPBA*	Biotin			
Comet assay				우육 핵DNA (손상도)

*EPBA: enzyme protein binding assay

2. 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용 및 범위
1차 년도 (1996)	*비타민 Biotin의 신분석법 개발 *대두단백질의 검출법 개발 *돈육의 식별법 개발 *Myosin변성도 측정에 의한 해동육 식별법 확립	-Biotin의 ELISA system 확립 -Biotin의 PBA system 확립 -대두단백질의 분리 -대두단백질의 ELISA system 확립 -돈육단백질의 분리 -돈육단백질의 ELISA system 확립 -Myosin fragment에 대한 항체생산 -Myosin의 ELISA system 확립
2차 년도 (1997)	*비타민 Pantothenic acid 신분석법 개발 *우유단백질의 분석법 개발 *계육의 식별법 개발 *Comet assay의 확립	-Pantothenic acid의 ELISA system 확립 -미생물법과 비교 -우유단백질의 분리 -우유단백질의 ELISA 확립 -계육단백질의 분리 -계육단백질의 ELISA 확립 -Myosin의 변성도 측정법 개발 -수입육판별을 위한 기준치 설정
3차 년도 (1998)	*비타민 D의 신분석법 개발 *계란단백질의 검출법 개발 *우육의 식별법 개발 *ELISA 및 Comet assay 에 의한 수입육의 판별	-비타민 D의 특이항체 생산 -비타민 D의 ELISA system 확립 -계란단백질의 항체생산 -계란단백의 ELISA system 확립 -우육단백질의 분리 -우육단백의 ELISA system 확립 -수입육의 DNA손상도 판별 -종합적인 수입육 판별능 평가

IV. 연구개발결과

1. 미량 비타민의 분석법 개발

가. Biotin의 신분석법 개발

생물특이적 기법 (biospecific method)을 이용한 biotin (비타민 H)의 신속 간편 분석법을 개발하기 위하여 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)과 효소-단백결합분석법 (enzyme protein binding assay: EPBA)을 확립하였다. Keyhole limpet hemocyanin (KLH)을 carrier protein으로 한 biotin-KLH conjugate를 제조하여 Freund's adjuvant와 유탁액을 만든 후 토끼에 면역하여 항 biotin 항혈청을 얻었다. 이 항혈청은 biotin의 유사 비타민인 biocytin에 대하여 177%의 교차반응을 보였으며 desthiobiotin 및 diamminobiotin, 2-iminobiotin 등의 다른 유도체에서는 교차반응이 일어나지 않아 특이성이 높은 것으로 나타났다. 정제된 항체를 이용하여 직접법에 의한 경쟁적 ELISA (competitive direct ELISA: cdELISA)로 biotin을 분석하기 위한 조건을 확립하였다. Biotin의 검출범위는 0.01 - 300 ng/ml (ppb)로 비교적 넓은 범위의 농도를 측정할 수 있었으며 검출감도도 0.01 ng/ml로 매우 높게 나타났고 분석시간은 약 1.5 시간이었다. Streptavidin과 biotin-KLH, biotin-LC-BSA를 이용하여 biotin을 분석하는 EPBA의 분석조건을 최적화 하였다. 이들에 의한 EPBA의 경우 biocytin에 대해서 각각 109%, 197%, 300%의 교차반응을 보였으며 다른 유도체에 대해서는 전혀 반응하지 않았다. Biotin 표준곡선에서 이들의 검출범위는 streptavidin에 의한 분석시 0.01 - 30 ng/ml로 비교적 넓었고 biotin-KLH와 biotin-LC-BSA에서는 모두 0.01 - 1.0 ng/ml (ppb)의 검출범위를 나타냈고 분석시간은 약 1.5 시간이었다. 한편 기존의 분석방법인 미생물 분석법 (microbiological assay: MBA)에서의 검출범위는 0.1 - 0.5 ng/ml (ppb)로 분석범위가 매우 제한되어 있었고 검출감도도 0.1 ng/ml로 비교적 낮았다. 또한 biocytin외에 desthiobiotin

과 같은 유도체에 대해서도 결합반응을 보여 각각 80.1%, 66.7%의 교차반응율을 나타냈고 분석시간은 약 48 시간이었다. 미생물 분석법과 ELISA 및 EPBA (streptavidin)에 의한 여러 식품의 biotin함량을 측정하였다. 우유의 경우 각각의 평균분석치는 32.20, 35.90, 32.10 ng/ml이었으며 과일플레이크에서는 각각 9.35, 16.5, 12.2 ng/g, 당근-파인애플 주스에서는 8.6, 15.2, 11.0 ng/ml로 각각 나타났다. ELISA 및 EPBA에 의하여 biotin의 분석회수율을 구한 결과, 우유의 경우 평균회수율은 각각 107.6%, 96.6%이었으며 과일플레이크에서는 76.7%, 73.4%의 회수율을 보였으며, 당근-파인애플 주스는 71.1%, 69.2%로 나타났다. 또한 각 시료에 대한 cdELISA 및 EPBA(streptavidin)의 분석치를 미생물 분석법에 의한 분석치와 비교하여 구한 상관계수는 cdELISA의 경우 $r=0.992$, EPBA (streptavidin)의 경우 $r=0.979$ 로 높은 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 이상과 같이, ELISA와 EPBA에 의한 biotin의 분석법은 기존의 미생물 분석법에 비하여 검출감도, 검출시간, 교차반응 등의 면에서 우수하며, 간편하게 다량의 시료를 동시에 분석가능한 것으로 나타났다.

나. Pantothenic acid의 신분석법 개발

Bromoacetyl chloride에 의한 방법으로 준비한 pantothenic acid-BSA (PA-Br-BSA)를 면역한 토끼로부터 pantothenic acid에 대해 특이적으로 결합하는 항pantothenic acid 항혈청을 생산하였다. 또한, periodate oxidaton 방법에 의하여 pantothenic acid-BSA (PA-Po-BSA)를 준비하고 이를 코팅용 항원으로 사용하였다. 항원을 코팅한 후 특이항체를 BSA의 존재하에서 pantothenic acid와 경쟁시키는 방식의 간접 경쟁 ELISA (competitive indirect ELISA; ciELISA)를 확립하였다. 그 표준곡선으로부터 검출한계는 1ug/ml임을 알 수 있었으며 특이항체는 pantothenic acid의 유도체인 pantoyllactine, pantethine, pantothenyl alcohol, Acetyl CoA 등과는 반응성이 없어, 특이성이 매우 높게 pantothenic acid의 검출이 가

능한 것으로 나타났다. 다음으로 미생물법에 의한 pantothenic acid의 분석조건을 확립하였다. 이 방법으로 검출가능한 pantothenic acid의 농도는 0.01ug/ml이상이었으며 소간, 식빵, 상추 등 식품시료에 대한 분석시 성분 표시와 비교적 잘 일치하는 결과를 보였다. 계란, 상추, 소간의 pantothenic acid 함량을 ELISA로 분석하고 그 결과를 MBA 분석치와 비교하였을 때, 계란과 소간의 분석 회수율은 각각 109% 및 64%로 비교적 양호하였으나 상추의 경우 ELISA결과가 MBA결과에 비하여 10배가량의 높은 수치를 나타내었다. 이는 시료의 분석시 전처리한 용액을 직접 분석에 사용하여 얻은 결과였는데 시료유래의 물질에 의한 방해작용 때문으로 생각되었다. 따라서, 전처리한 용액을 더욱 희석하여 ELISA를 행하였으나, 이 경우에는 표준곡선상의 검출감도범위를 벗어나 분석이 불가능한 문제가 있어 검출감도의 개선이 요구되었다.

다. 비타민 D의 신분석법 개발

비타민D₂와 비타민D₃는 steroid부분이 공통구조를 갖고 있으며, ergosterol은 비타민D의 전구체로 (provitamin D)로서 UV를 조사하면 비타민D로 전환되므로, ergosterol을 시작물질로 하여 면역원을 제작하였다. 즉, ergosterol의 22번 탄소위치를 aldehyde로 전환시키고 이를 ethylenediamine과 반응시켜 amino기를 부착시킨 후, UV조사 및 열처리로 활성형 Vit.D의 haptent처리를 완료하였다. WSC (water soluble carbodiimide)방법으로 haptent의 amino기와 carrier protein인 BSA의 carboxyl기를 결합시켜 면역원인 비타민D-BSA conjugate를 준비하였다. 면역원 500 μ g을 Freund's complete adjuvant (FCA)와 동량비로 혼합하고 유탁액을 만들어 토끼 뒷발바닥에 마리당 1ml씩 피하주사하였다. 2주일 후 FCA대신 Freund's incomplete adjuvant (FIA)를 사용하여 추가 면역을 실시하였다. 면역 1주일 후, 토끼의 귀정맥으로부터 채혈하여 항혈청을 분리하였다. 항체의 역가는 비경합 ELISA에 의해 측정하였으며, 그 결과

수차례 면역후의 항체가를 높아졌음을 확인하였다. 그러나, 생산된 항체는 면역원인 Vit.D-BSA에 대하여 반응하였지만, 실제로 hapten인 Vit.D에 대하여 반응하지 않음이 간접경합 ELISA (ciELISA)에서 밝혀졌다. 또한, 정제한 특이항체 및 Vit.D-HRP conjugate를 이용한 직접경합 ELISA (cdELISA)에서도 경합현상을 보이지 않았다. 이는 아마도 면역원으로 사용한 conjugate에 문제가 있어서 결과적으로 carrier protein인 BSA에 대한 항체가 많이 생산되었고, 원하는 hapten인 Vit.D에 특이적인 항체가 생산되지 않은 것으로 추측된다. 따라서, hapten의 처리부터 다시 실시하고 각 처리 단계마다 구조확인을 병행하고 있다.

2. 비육류 단백질의 분석법 개발

가. 대두단백질의 분석법 개발

식품중 대두단백질의 분석을 위한 효소면역측정법 (ELISA)을 개발하였다. 열에 안정한 대두단백질의 주요구성분의 하나인 11S acidic subunits (11S, AS)를 미변성 대두분말로 부터 분리하였다. 또한, 완충액에 용해시킨 분리대두단백 (ISP)을 동결건조하고, 이들을 면역원으로 하여 항체를 생산하였다. 생산한 여러 종류의 항체 [항11S,AS항체, 항ISP/SDS항체, 항ISP(-ME)항체, 항SP/urea항체]를 이용하여 간접경합 ELISA (ciELISA)의 조건을 확립하고, 이들 항체의 대두단백질에 대한 반응성을 조사하였다. 그 결과 항11S, AS 항체를 이용한 ciELISA가 가장 양호한 검출 감도를 나타내었으며, 표준곡선상에서 분리대두단백 (ISP)의 검출한계는 0.3ug/ml이었다. 항11S-AS항체의 다른 단백질과의 교차반응을 검토한 결과, 탈지분유와 카제인 (CN)에 대하여 각각 0.6, 0.3%가량의 미약한 반응성을 보였으나 난백분말과Ovalbumin (OA)에 대하여는 전혀 반응하지 않았다. ISP를 분석하기 위한 시료처리는 Urea-DTT를 이용한 가용화, 100°C에서 1시간 가열, renaturation의 방법을 채택하였다. 이 조건하에서 특이항체가 인식하는 ISP의 열안정성 (60 -90°C)은 매우 양호하였다. ISP를 0.5

- 3%첨가하여 시험제조한 소세지의 경우 분석회수율은 평균 83% (C.V., 19%)로 나타나, 본 연구에서 개발한 대두단백질 분석법은 양호함이 밝혀졌다. 또한, 시판 소세지 6점에 함유된 ISP의 함량은 평균 1.27%로 나타났다.

나. 우유단백질의 분석법 개발

우유단백질중 가장 많은 성분인 α s1-casein을 1차적인 검출대상으로 하여 이를 분리정제하고 토끼에 면역하여 특이항체를 생산하였다. α s1-casein의 정량을 위한 ciELISA의 조건을 확립하였으며, 0.1ug/ml이상 농도의 정량이 가능함을 알 수있었다. α s1-casein이외의 유단백질에 대한 특이항체의 반응성을 조사한 결과, 탈지유에 대하여는 높은 반응성을 보였으나 β -casein과 WPI에 대하여는 1/1,000가량의 낮은 반응성을 보이고 BSA, α -lactoglobulin, β -lactoglobulin, 분리대두단백(ISP)에 대하여는 반응하지 않아 α s1-casein에 대한 특이성이 매우 우수한 항체가 생산되었음을 확인하였다. ELISA의 검출감도를 높이고 보다 신속간편한 방법을 확립하고자 항체의 정제 및 항체-효소 결합물을 준비하여 sandwich ELISA를 확립하였다. 여기에서 α s1-casein의 검출한계는 0.01ug/ml로 매우 우수하였다. Sandwich ELISA를 이용한 시유, 요쿠르트, 분유 등 시료중의 α s1-casein을 정량하였다. 우선, 액상유제품 시료에 대하여 α s1-casein을 분석한 결과, 시유에서 3.3%가량으로 나타나 기대치 (1.3%)보다 높게 나타났으며, 농후요구르트에서도 이와 유사한 경향을 보였고, 액상의 야쿠르트에서는 0.5%로 나타났다. 분말상 시료에 대하여 분석한 결과, 탈지분유에서 약 34%로 나타나 이 경우에도 기대치 15%보다 높게 나타났다. ISP, WPI, 대용유에서는 각각 0.08, 0.03, 0.09%로 나타났다. 따라서, 일부 중요 유제품시료에서 α s1-casein의 ELISA분석치가 2 -3 배 높게 나타나는 불일치는 표준단백질과 시료 단백질의 용해도 차이에서 기인하는 바가 큰 것으로 생각되며 이를 개선할 필요가 있다. 희석한 우유 시료에 α

sl-casein용액을 첨가하고 ELISA를 행한 결과, 첨가한 부분에 대한 분석회수율은 1 - 10%농도 범위내에서 평균 104%로 나타나 양호하였다.

다. 계란단백질의 분석법 개발

식품중 계란단백질의 분석을 위한 효소면역측정법 (ELISA)을 개발하였다. 대표적인 계란단백질의 하나인 오보뮤코이드 (OM)는 열에 안정할 뿐만 아니라 알레르겐으로 알려져 있으므로, 이를 Freund's adjuvant와 함께 토끼에 수차례 면역하여 항혈청을 얻었다. 이로 부터 정제한 특이항체를 이용하여 간접경합ELISA (ciELISA)의 조건을 확립하였다. 그 표준곡선상에서 OM의 검출감도는 0.03ug/ml이었다. 다른 단백질과의 교차반응을 검토한 결과, 오발부민 (OVA), 탈지유, 카제인 (CN)에 대하여 각각 0.4, 0.2, 0.04%의 반응성을 보였으나 유청단백질 (WPI)와 대두단백질 (ISP) 등에 대하여는 전혀 반응하지 않아 항OM항체의 특이성이 양호하였다. 또한 OM은 열안정성이 매우 우수하여 OM을 60°C - 90°C에서 10분간 처리후 ciELISA로 분석시 반응성은 평균 90%로 큰 변화가 없었다. 이는 열에 매우 불안정한 OVA의 경우와는 매우 대조적이었다. 난백을 0.5 - 3%첨가하여 시험제조한 소세지를 균질화하여 얻은 용액을 항체용액과 반응시킨 후 행한 ciELISA분석의 결과 평균 65.5%의 분석회수율을 보였다. 또한, 시판 계맛살과 소세지에 대한 난백함량을 분석하였을 때 그 분석회수율은 각각 108%와 127%이었다. 따라서, 본 연구에서 개발한 ELISA는 계란단백질의 분석법으로 활용 가능한 것으로 나타났다.

3. 원료육 단백질의 식별법 개발

가. 돈육의 식별법 개발

축종별 원료육 지표단백질을 선택, 실용화하기 위한 기본적 조건은 수용성, 염용성, 난용성 단백질중 세포막으로부터 분리 정제가 간편하고, 재현성이 우수하며, 종 특이적으로 발현되는 성분이어야만 한다. 이러한

관점에서, 먼저 수용성 및 염용성 단백질을 비교 분석한 결과, 단백질의 추출량은 생리 식염수를 사용한 경우 그 함량이 많아졌지만, SDS-PAGE에 의한 분석결과, 단백질의 생화학적인 특성을 유지하고 현상에서의 활용방안을 고려하였을 때, 돈육중의 수용성 단백질을 이용하는 것이 가장 타당한 것으로 확인되었다. 돈육 특이적인 성분을 검색한 결과, 약 32kDa 및 55kDa의 성분이 돈육에 있어서 종 특이적으로 발현되고 있는 것이 발견되었다. 또한 75°C에서 30분간 가열처리 한 돈육의 경우, 계육 및 우육과 상이한 성분이 내열성 성분으로 존재하고 있는 것이 확인되어, 가열 돈육을 총 4회에 걸쳐 면역한 후, 복합항체를 생산하였다. 비가열 및 가열(75°C/15분) 수용성 돈육단백질 100 μ g/ml를 100 μ l/well로 coating한 후, 생산된 항혈청을 각각 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000으로 희석하여 그 역가를 ELISA검사법(Screening法)을 실시하여 측정된 결과, 1:32,000으로 희석한 항혈청의 경우, O.D 405nm에서 가열돈육 0.2이상, 비가열 돈육 0.07을 나타내었다. 돈육과의 경합반응에서 0.01 μ l/well에서 경합이 시작되었으며, 그 이상의 농도에서 직선적으로 역가가 감소하고 있는 것이 확인되어, 본 연구에 의해 만들어진 돈육 복합항체는 돈육과 특이적으로 결합하고 있는 항체임이 입증되었다. 그러나, 우육, 계육, 염소육, 칠면조육, 오리육, 토끼육, ISP, 그리고 계란단백질과는 전혀 경합이 발생하지 않는 것이 확인되었다. 따라서 iELISA에 의해 강하게 반응한 우육 및 계육은 돈육 복합항체와는 비특이적으로 반응하며, 이러한 비특이적인 반응은 돈육과의 결합에 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 비가열육의 결과와 유사하게 나타났으며, 이는 ciELISA에 의해 육혼합물 중의 돈육을 검증할 수 있다는 것이 확인되었다. 또한 100%돈육 가열훈연 소시지(프랑크푸르트형 소시지)를 1.0% SDS를 이용하여 추출한 후, 75°C/15분간 가열한 후 분취한 내열성 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 돈육을 검증할 수 있음이 확인되었다. 따라서 본 연구진에 의해 생산된 돈육 특이적인 항체를 이용하여

원료육 혼합물은 물론이고 가열 축육제품중에 혼입되어 있는 돈육의 량을 정량적으로 분석할 수 있음이 확인되었다.

나. 계육의 식별법 개발

증류수, 0.85% NaCl, 0.5% SDS, 그리고 0.5% Triton X-100을 이용하여 계육의 추출량을 비교 분석한 결과, 증류수에서는 가슴부위 19.2, 갈비부위 17.4, 다리부위 18.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ protein이 추출되었으며, 부위별 유의적 차이는 없었으며, SDS-PAGE에 의한 분석에서도 부위별 특이적인 성분은 검출되지 않았다. 또한 추출용매에 따른 축종별 특이적 성분은 검출되지 않아 증류수를 이용하여 추출한 단백질을 이용하여 본 연구를 실시하였다. 증류수를 이용하여 계육, 한우육, 홀스타인육, 그리고 돈육을 처리하여 회수한 가용성 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 약 50 kDa이 특이적인 성분으로 확인되었으며, 이 성분을 SDS-PAGE법으로 정제한 결과, 약 80%의 회수량을 나타내었다. 따라서 본 연구진에 의해 확립한 단백질 정제법은 항체를 생산하기 위한 면역원의 정제에 필요한 막대한 시간과 예산을 절약할 수 있는 매우 간단하고 신속한 방법으로써, 단백질에 대한 연구는 물론이고 단일 항체 생산에 필요한 항원의 조제방법으로 크게 이용될 수 있으리라 사려된다. 50kDa에 대한 이 항혈청의 특이성을 검사하기 위하여 immunoblotting을 실시한 결과, 50kDa성분과 특이적으로 반응하고 있는 것이 확인되었다. 또한 계육, 한우육, 돈육, 그리고 ISP를 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 가열한 후, 15,000rpm으로 15분간 원심분리하여 열변성된 성분을 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과, 비가열육과 동일한 결과를 나타내었다. 비가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 0.05 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 계육 함량에서부터 강한 경합반응을 나타내었으며, 그 이상의 계육의 량에서는 거의 직선적인 경합을 나타내었다(Fig. 2-12). 그러나 돈육, 오리육, 그리고 칠면조육에서는 거의 경합이 일어나지 않는 것이 확인되었으나, 우육의 경우, 500 $\mu\text{g}/\text{well}$ 이상에서 약 50%의 경합이 일어나는 것으로 나타났으나,

이는 계육의 10^{-4} 의 감도로써 큰 문제점은 없을 것으로 사려된다. 가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 비가열 계육보다 강한 경합반응을 나타내었으며, 이는 항원으로 가열 계육 성분을 사용하였기 때문이라 사려된다. 또한 비가열 우육과 반응한 계육 복합항체는 그 항원으로 가열 육을 사용함으로써 교차반응이 거의 없는 것으로 나타났으며, 그 이외의 이종 단백질들과는 거의 반응하지 않는 것이 확인되어, 계육 복합항체를 이용한 ciELISA에서 계육의 검증은 충분히 가능할 것으로 확인되었다. 조제한 순수한 계육 소시지를 0.5% SDS를 이용하여 추출한 후, iELISA를 실시한 결과, 역가가 비가열 계육보다 약 50%감소하였으나, iELISA에 의해 충분히 검출가능한 역가로 판단되어, 본 연구진에 의해 작성된 계육 복합항체를 사용함으로써 육혼합물, 또는 육제품중에 혼입되어 있는 계육을 정량적으로 검사할 수 있는 것이 확인되었다. 계육 복합항체를 이용하여 Dot blotting을 실시한 결과, 계육의 검출한계는 $1\mu\text{g}/\text{well}$ 이었으며, 이러한 검출강도는 계육의 함량에 대하여 의존적이었다. 그러나, 이러한 검출감도는 ELISA에 비하여 매우 낮은 것이지만, 분석의 간편성 및 정성적 분석을 추구할 경우 충분한 검출감도라 판단되었다. 시중에 유통되고 있는 비엔나소시지(돈육 90.14%), 불고기햄(계육 28.89%, 칠면조 31.44%), 그리고 캔터키프랑크소시지(계육 46.52%, 돈육 24.92%)를 구입하여 수용성 단백질을 추출한 후, 100°C 에서 30분간 가열하여 분석한 결과, 농도 의존적으로 반응하여, 계육 특이적인 항체를 이용하여 육제품 중에 혼입되어 있는 계육을 검증할 수 있음이 확인되었다.

다. 우육의 식별법 개발

증류수, 0.85% NaCl, 0.5% SDS, 그리고 0.5% Triton X-100을 이용하여 우육을 추출한 결과, 부위별 추출량 및 특이성분은 검출되지 않았다. 증류수로 추출한 한우육, 홀스타인육, 돈육 및 계육을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 17% SDS-PAGE분석에 의해 한우육의 19.3kDa성분이 축종특이적 성분

으로 확인되었으며, 이 성분은 홀스타인 육에서도 동일하게 검출되었다. 19.3kDa을 SDS-PAGE법으로 정제한 결과, 약 27.6%의 회수율을 나타내었다. 100℃로 가열할 경우, 우육은 약 83% 열 변성되어 침전하였으나 계육은 약 78% 열변성 하는 것으로 나타났다. 또한 우육을 100℃에서 30분간 가열한 후, 그 내열성 획분을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 19.3kDa이 열에 매우 강한 것으로 확인되었다. 100℃/30분간 가열한 후 회수한 내열성 획분을 3회에 걸쳐 토끼에 면역한 후(1mg/회), ELISA를 이용하여 그 역가를 검사하였다. 그 결과, 가열 우육은 비가열 우육보다 전체적으로 높은 역가를 나타내었으며, 1:32,000의 희석비율에서도 0.3이상의 O.D.값을 나타내었다. 우육 복합항체와 돈육 및 계육과의 교차반응을 검사한 결과, 우육 복합항체는 돈육 및 계육과 강한 교차반응을 하고 있는 것이 확인되었다. 우육 복합항체에 대한 우육, 돈육, 계육, 염소육, 오리육, 칠면조육, 토끼육, ISP, 그리고 계란 단백질의 ciELISA를 실시한 결과, 우육은 0.1 μ g/well에서부터 강한 경합반응이 일어나는 것이 확인되어, 본 연구에 의해 작성된 우육 복합항체는 우육 단백질과 특이적으로 결합하고 있는 것으로 나타났다. 돈육 및 칠면조의 경우 약한 경합을 일으키고 있었으나, 우육의 검증에는 큰 영향을 일으키지 않는 수준이었으며, 기타 육 단백질은 전혀 경합반응이 일어나지 않는 것으로 확인되었다. 가열 육단백질과 우육 복합항체와의 경합반응을 조사한 결과, 비가열 육과의 경합반응보다 약하게 일어나고 있는 것이 확인되었으나, 비가열육의 결과와 유사하게 나타났다. 따라서 본 연구에 의해 작성된 우육 특이적인 복합항체를 이용할 경우, 원료육 혼합물 및 축육제품중에 혼입되어 있는 우육의 검증은 가능할 것으로 확인되었다. 이를 이용한 분석법을 실용화할 경우, 축육제품 중의 원료육을 정확하고 객관적으로 분석할 수 있을 것이며, 특이적인 항체를 이용한 분석 Kit의 개발도 가능하리라 사려된다. Dot blotting을 이용하여 내열성 우육 단백질에 대한 복합항체 검출한계를 측정한 결과 약 10 μ g/well이었으며, 농도의 의존적인 감도를 나타내었다. 원료육 혼합물 또는 가공 육제품중에 혼입되

어 있는 우육은 양적으로 매우 많으며, 농도가 매우 낮더라도 농축하는 것이 매우 간단하므로, 비록 ELISA의 검출감도보다 매우 낮은 수준이지만 그 실용성을 감안할 때, Dot blotting은 그 이용차기는 매우 크며, 현장적용을 위한 검출 Kit의 개발도 가능하리라 사려된다.

4. 수입육 판별 및 분석기술 개발

가. ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발

우선 myosin 및 myosin의 S-1, light meromyosin(LMM) subfragment를 분리 정제하고 이들 각각에 대한 항체를 생산하여 확립된 ELISA 조건에 따라 분석한 결과 각 항체는 매우 특이성이 높았으며 회수율도 매우 우수하였다. 이 방법을 따라 우육의 냉장 및 동결처리에 따른 변성도를 측정할 결과, myosin과 LMM의 동결저장에 따른 면역반응성(immunoreactivity)은 저장기간이 경과됨에 따라 점차 감소하는 경향을 보여주었는데 특히 LMM의 경우가 두드러져 동결저장 중의 변성이 주로 light meromyosin(LMM) 부분에서 발생되고 있다는 것을 보여주었다. 동결저장온도는 -20°C 의 경우가 가장 심한 반응성 변화를 초래하였다. 한편 동결과 해동을 반복할 경우는 myosin, S-1, LMM 모두 면역반응성의 변화가 매우 크게 나타났으며 동결기간에 따른 변화에 비해 더 심한 감소현상을 보여주었다. 냉장저장에 의한 myosin 분자의 반응성 변화는 15일 저장기간 동안 어떠한 유의성도 발견되지 않음으로써 본 연구에서 사용한 통제구 (24시간 예냉을 거친 식육)를 기준값으로 사용할 수 있다고 판단되었다. 이와 같이 확립된 방법을 따라 무작위로 구입한 수입육의 동결 처리 결과를 분석한 결과, 저장기간과 해동횟수 등의 조사에서 얻은 값을 수입육에 비교하였을 때 수입육의 면역반응력결과로부터 시료육의 동결저장 기간과 해동횟수에 대한 추정이 가능하였다. 얻어진 결과로부터 수입육 판별방법으로서의 ELISA법은 충분한 실용화 가능성을 나타내었으며, 보다 구체적인 분석 조건을 확정하고 보다 많은 무작위 추출 수입육 시료에 대하여 blind test를 수행하는 연구를 뒷받

침하여 현장에서 사용할 수 있는 분석방법을 확립할 수 있을 것으로 판단되었다.

나. 저장중 DNA손상 측정을 위한 Comet assay법의 개발

Comet assay 수행방법 중 가능한 온도를 낮추고 물리적인 조건하에서 핵체를 분리한 후 중성의 조건하에서 실험(neutral lysis와 neutral electrophoresis)을 하는 것이 최적 조건임을 확인하였다. 우선 우육 시료의 냉장에 의한 DNA 손상은 3일까지 근육핵내 DNA 손상의 급격한 증가를 나타내다가 3일 이후부터는 완만한 증가세를 나타내었으며, 손상등급은 다양한 분포를 나타내었다. 동결기간에 따라 나타나는 손상의 경우는 동결처리에 의해 일어난 손상도가 동결저장 시간에 따라서는 유의성있는 차이를 보이지 않았고 핵들의 손상등급 분포 또한 냉장에 의한 경우와 유사하였다. 동결 및 해동 반복처리에 의한 DNA 손상정도를 검사한 결과, 동결 해동 1회(1 cycle)는 비처리 신선육과 구분할 수 없었으나 2 cycle부터는 그 손상의 정도가 급격하게 증가되었으며, 3 cycle부터는 냉장이나 동결기간과는 매우 다른 아주 심한 손상등급내의 핵들의 급격한 증가를 보였다. 한편 방사선 조사량에 따른 DNA 손상정도의 검사를 위해 신선우육에 방사선 처리를 하였을 경우, 이미 1 kGy 이상의 조사구부터 냉장저장 우육, 동결저장 우육과는 확연히 구별되는 손상의 특징적인 형태를 나타내었으며, 1 kGy의 손상 특징이 동결 해동 반복 3 cycle의 손상형태과 유사한 결과를 나타내었다. 이상과 같이 얻어진 분석조건을 토대로 무작위 구입한 수입육에 대한 blind test를 실시한 결과, 우선 mean tail length 값으로 비교할 때는 평균적으로는 수입육의 손상도가 큰 것으로 나타났으나 개별적인 수입육 시료에 대해서는 한우육과 구별할 수 없는 경우가 다수 존재하는 것이 확인되었다. 그러나 tail length로 구분한 손상등급별로 핵들의 분포정도를 비교하였을 때 수입육과 한우육은 손상이 없는 등급과 가장 심한 손상등급에서 특징적인 분포를 나타냄으로써, Comet assay를 수입육 판별에

이용함에 있어서는 mean tail length의 단순한 비교보다는 양쪽 극단의 손상등급에 대한 분포도를 비교함으로써 유의성있게 판별을 수행할 수 있는 것으로 판단되었다.

V. 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 비타민, 비육류단백질, 육류단백질, 육류의 품질평가를 위한 신분석법의 개발현황을 중점적으로 정리하면 다음과 같다. 우선 비타민 분석법 중에서 biotin의 경우는 ELISA 및 EPBA가 모두 성공적이었으나 pantothenic acid의 ELISA분석법은 검출감도가 예상보다 10배정도 낮았으며 비타민 D의 ELISA분석법은 면역원의 새로운 합성 및 이를 이용한 특이 항체의 생산이 요구되었다. 비육류단백질 분석법 중에서 대두와 계란 단백질의 분석법은 성공적이었으나 우유단백질의 분석법은 시료중 카제인의 용해도를 개선할 필요가 있었다. 육류단백질의 분석법 중 돈육의 ELISA분석법은 가열 및 비가열 육에서 만족스러운 결과를 보였으나 계육의 ELISA분석법은 가열육에 대한 분석이 어려웠다. 계육의 비가열 육 분석법 및 우육의 가열 비가열 육 분석법은 다른 육에 대한 교차반응이 다소간 나타나면 역흡수처리를 통한 개선이 필요하였다. 해동육 및 방사선조사육의 분석법은 성공적으로 나타났다.

이상과 같이 일부 분석법 중 연구가 미진한 부분은 보완하여 개발을 완료할 필요가 있으며, 본 연구에서 성공적으로 확립한 검출법인 biotin분석법, 대두단백질 분석법, 계란단백질 분석법, 돈육의 분석법, 해동육 분석법, 방사선조사육 분석법은 지금 당장이라도 다음과 같은 두 방향으로 활용이 가능하다: (1) 개발된 방법을 **관련기관에서 분석에 활용할 수 있도**

록 하는 것이고, (2) 다른 한편으로는 검출키트의 개발에 활용하는 것이다.

즉, 본 연구에서 성공적으로 개발한 분석기술을 관련기관 (축산물검사소, 축협, 육가공업체, 유가공업체, 농산물검사소, 사료검사소, 기타)에 (1)집체교육 등을 통하여 전수하고, 필요시 (2)특이항체 등 시약을 공급한다. 해당기관은 각기 그 필요에 따라 구체적인 활용방안을 마련하고 분석현장에서 이용할 수 있도록 한다.

또한, 가공식품산업이 발달한 구미에서는 이미 단백질 등의 검출키트가 부분적으로 생산판매되고 있으며 이를 이용하면 비숙련자라도 손쉬운 분석이 가능한데 그 수입 판매가격은 대체로 분석 1점당 1 - 2만원 가량으로서 고가이다. 따라서, (1)육가공 등 식품산업의 품질관리를 효율적으로 수행할 수 있는 기반조성, (2)국산화를 통한 일부 검출키트의 수입대체, (3)분석기술의 선진화를 위하여 검출키트를 생산한다. 분석키트의 생산에는 기업의 참여가 필요하며 이를 적극 유도하기 위한 지원 (기술이전시 유리한 조건의 부여 등)이 요망된다.

특히, 육류의 품질평가법으로서 ELISA법과 Comet assay법은 연구의 독창성이 우수하며 현장적용의 필요성이 높은 방법으로서, 이들 방법을 활용하면 수입우육에 대응하기 위한 분석법으로 활용가능하다. 즉, 우육의 해동유무와 방사선조사 유무를 판별할 수 있다. 일차로 ELISA에 의한 우육의 냉동-해동여부를 판별하고, 여기에서 냉장육으로 밝혀진 우육에 대하여 2차로 comet assay에 의한 방사선조사 유무를 식별할 수 있다. 해동은 육류의 품질저하를 초래하며 방사선조사육은 안전성의 문제로 아직 국내에서 허용되지 않고 있으므로, 이들 방법을 공인 분석법으로 채택하면 국내산 우육과 수입우육의 차별화를 통하여 국내 축산업의 보호효과를 얻을 수 있다.

또한, 국내 우육의 유통시장에 대한 감시방법으로 활용가능하다.

기본적으로 새로운 분석방법의 활용은 식품의 고급화에 대한 생산자 및 소비자의 인식과 분석기관의 기술수준을 향상시키는데 크게 기여할 것으로 생각한다. 아울러, 그 실효를 거둘 수 있도록 대외적인 홍보를 적극 지원할 필요가 있다.

SUMMARY

1. Development of Systems for the Detection of Trace Vitamins

A. Biotin

In order to develop biospecific methods for more rapid and reproducible analysis of biotin, which is known as vitamin H, the conditions for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-protein binding assay (EPBA) were established. Anti-biotin anti-serum was obtained from immunized rabbits injected with emulsion of biotin-KLH conjugate and Freund's adjuvant. The anti-serum showed cross-reactivity on biocytin, a derivative of biotin, at the rate of 177%, but not on other derivatives such as desthiobiotin, diaminobiotin, 2-imino-biotin. Specific antibody for biotin was purified from the anti-serum through protein A column and desalting column. The conditions of competitive direct ELISA (cdELISA) were established. Detection range of biotin concentration by cdELISA was 0.01-300 ng/ml(ppb). It took 1.5 hr to analyze biotin by cdELISA. The conditions of EPBA were established with streptavidin, biotin-KLH and biotin-LC-BSA. The three conjugates showed cross-reactivities on biocytin at the rate of 109%, 197% and 300%, respectively, but not on other derivatives. Detection ranges of biotin concentration by EPBA with three conjugates were 0.01 - 30 ng/ml, 0.01 - 1.0 ng/ml, and 0.01 - 1.0 ng/ml(ppb), respectively. It took 1.5 hr to analyze biotin by EPBA. Detection of biotin by microbiological assay (MBA), a traditional method of analysis of biotin, was rather restricted in range and nonspecific. It showed cross-reactivities on biocytin and desthiobiotin at the

rate of 80.1% and 66.7%, respectively. Detection range of biotin concentration by MBA was 0.1 - 0.5 ng/ml(ppb). It took 48 hr to analyze biotin by MBA. Concentrations of biotin in some foods were analyzed by the established biospecific methods. The mean concentrations of biotin detected by MBA, ELISA and EPBA (streptavidin) were 32.2, 35.9, 32.1 ng/ml in milk, 9.35, 16.5, 12.2 ng/g in fruit flake, 8.6, 15.2, 11.0 ng/ml in pine-carrot juice. In the spike test, the recovery rates of biotin by ELISA and EPBA were 107.6% and 96.6% in milk, 76.7% and 73.4% in fruit flake, 71.1% and 69.2% in pine-carrot juice, respectively. The correlation coefficient of MBA and ELISA was $r=0.992$, and that of MBA and EPBA was $r=0.979$. As the results, analysis of biotin by ELISA or EPBA was efficient compared with MBA in sensitivity, detection range and cross-reactivity, etc. Furthermore, a variety of samples could be analyzed rapidly and conveniently at one time by these biospecific methods, which enables them to be used practically.

B. Pantothenic acid

In order to develop ELISA for pantothenic acid, antibody was produced and ELISA conditions were established. Anti-pantothenic acid antibody was produced by immunizing rabbits with pantothenic acid-BSA conjugates prepared by the bromoacetyl chloride method (PA-Br-BSA). Another pantothenic acid-BSA conjugates prepared by the periodate oxidation method (PA-Po-BSA) was used as coating antigen for ciELISA, in which free pantothenic acid was competed with PA-Po-BSA to the specific antibody in the presence

of BSA. The Detection limit of pantothenic acid by the ciELISA was 1 ug/ml (ppm). The antibody showed almost no cross-reactivity toward derivatives of pantothenic acid such as panthoyllactine, pantethine, pantothenyl alcohol, and Acetyl CoA. On the other hand the detection limit of pantothenic acid by microbiological assay (MBA), a traditional method of analysis for pantothenic acid, was 0.01 ug/ml. And assay results of pantothenic acid in some food such as cow's liver, bread, and lettuce by the MBA accorded with food tables. Assay recoveries of pantothenic acid in egg and cow's liver by ciELISA were 109% and 64% respectively with reference to the MBA results. However, in case of lettuce the recovery was as high as 10 times. Overall more sensitive ELISA system was needed for effective assay of pantothenic acid from food samples.

C. Vitamin D

In order to develop ELISA for vitamin D, vitamin D-BSA conjugate was immunized into rabbits. Vitamin D₂ and D₃ has common structure in the main steroid skeleton, and ergosterol is the precursor of vitamin D. So the immunogen was prepared as follows: Functional group of carbon No. 22 of ergosterol was modified to aldehyde, followed by attachment of amine group to the end, and transformed to active vitamin D form on main structure. The hapten was conjugated to BSA by the WSC (water soluble carbodiimide) method. It was identified that produced antiserum had affinity to the immunogen as determined by non competitive ELISA. However, free vitamin D did not bind to the antibody as

processed food by the ciELISA system was very effective.

B. Milk Proteins

An ELISA for the detection of milk proteins was developed. α s1-casein, a major and heat stable component of milk proteins was purified, and immunized into rabbits for the production of specific antibody. When the conditions of ciELISA were established, the detection limit was 0.1 ug/ml. Cross-reactivities of the antibody toward skim milk, β -casein, WPI, BSA, α -lactoglobulin, β -lactoglobulin, and ISP were 30, 0.1, 0.1, 0, 0, 0, and 0%, respectively. When the conditions of sandwich ELISA were established, the detection limit was 0.01ug/ml. The concentration of α s1-casein in market milk, semi-curd yogurt, and liquid yogurt as determined by sandwich ELISA was 3.3% (expected, 1.3%), 3.5%, and 0.5%, respectively. The concentration of α s1-casein in skim milk, ISP, WPI, milk substitute as determined by sandwich ELISA was 34% (expected, 15%), 0.08%, 0.03%, and 0.09%, respectively. In the spike test of α s1-casein at 1 - 10% in milk, mean assay recovery was 104%. Somewhat higher recovery of casein in sample may result from different protein solubility between standard and sample α s1-casein. So it should be studied to solve this problem.

C. Egg Proteins

An ELISA for the detection of egg proteins was developed. Ovomuroid (OM), a major and heat stable component of egg proteins was immunized into rabbits for the production of specific antibody. When the conditions of ciELISA were established, the

determined by ciELISA. That is, in the ELISA, competition between free vitamin D and vitamin D-HRP conjugate to the antibody was not occurred. It may result from improper immunogen preparation. Therefore the whole steps for the vitamin D-BSA conjugate were under repetition with strict structure identification of each intermediate product.

2. Development of Systems for the Speciation of Non-Meat Proteins

A. Soybean Proteins

An ELISA for the detection of soybean proteins was developed. 11S acidic subunits (11S.AS), heat stable components of soybean proteins were purified, and immunized into rabbits for the production of specific antibody. When the conditions of ciELISA were established, the detection limit was 0.3 ug/ml. Cross-reactivities of the antibody toward skim milk, casein, egg white powder, and ovalbumin were 0.6, 0.3, 0, and 0%, respectively. The solubility of processed soybean proteins was very poor, so pre-treatment of sample for the ciELISA was important and managed to establish. The procedure was to solve sample proteins by the treatment of urea-DTT solution, to heat at 100°C for 1 hr, and finally to renature. Under this condition, heat stability of ISP recognized by specific antibody in ciELISA was very stable. In the spike test of ISP at 0.5 - 3% in lab-made sausage, mean assay recovery was 83% (C.V., 19%). When ISP in commercial sausage (n=6) was determined by ciELISA, mean concentration was found to be 1.27%. As the results, analysis of soybean proteins in

detection limit was 0.03 ug/ml. Cross-reactivities of the antibody toward ovalbumin, skim milk, casein, WPI, and ISP were 0.4, 0.2, 0.04, 0, and 0%, respectively. Heat stability of OM as determined by ciELISA was very stable, which is in contrast to ovalumin. Sample treatment for the ciELISA was established and the procedure was to homogenize sample, and to dilute. In the spike test of egg white powder at 0.5 - 3% in lab-made sausage, mean assay recovery was 65.5%. When egg white in commercial crab meat analog and sausage was determined by ciELISA, each concentration was found to be 108% and 127%, respectively. As the results, analysis of egg proteins in processed food by the ciELISA system was very effective.

3. Development of Systems for the Speciation of Meat Proteins

A. Pork

The components of approximately 32 and 55 ada were specifically found in pork. Heat-resistant, pork-specific components were observed when meat samples were treated at 75⁰C for 30 min. Titration study using LISA in which polygonal antibody against heat-treated pork-specific meat protein as antigen was employed, demonstrated that AD values at 405 am were 0.2 and 0.07 in heat-treated and non-treated pork, respectively at 1:32,000 dilution of the antibody. LISA study using pork-specific polygonal antibody showed that the antibody reacted specifically with pork rather than beef, chicken, goat, turkey, duck meats, ESP or egg protein. And this antibody also reacted with meat proteins extracted from pork Frankfurt sausage treated at 75⁰C for 15 min,

demonstrating that pork-specific antibody produced in the present study would be applied for qualitative and quantitative determination of raw meat as well as processed meat products.

B. Chicken Meat

The amounts of meat proteins in various parts of chicken meats extracted with H₂O, 0.85% NaCl, 0.5% SDS or 0.5% Triton X-100 were not significantly different. SDS-PAGE study demonstrated that water-soluble protein components of about 50 kDa were found specifically in chicken meats. Immunoblotting study in which polyclonal antibody against chicken meat-specific protein component (50 kDa) demonstrated that this antiserum reacted specifically with this component. Indirect competitive ELISA (ciELISA) study using non-treated meat proteins demonstrated that strong competition occurred from 0.05 ug of chicken meat per well. When pork, duck or turkey meats were used, no competition was observed. Although beef at the concentration of 500 ug/well showed 50% competition, it would be negligible because the detection limit was very low (10^{-4}) compared with that for chicken meats. Dot blotting study using chicken-specific polyclonal antibody demonstrated that detection limit was 1 ug/well. Although the sensitivity of dot blotting was lower compared with ELISA, dot blotting would be acceptable specially for qualitative analysis and rapid determination. Chicken-specific antibody also reacted, in dose-response manner, with meat proteins from processed meat products, such as Vienna sausage (pork 90.14%), Bulgogi Ham (chicken 28.89%, turkey

31.44%) or Kentucky-Frank sausage (chicken 46.52%, pork 24.92%) treated at 100°C for 30 min, demonstrating that pork-specific antibody produced in the present study would be applied for qualitative and quantitative determination of raw meat as well as processed meat products.

C. Beef

The amounts of meat proteins in various parts of beef extracted with dH₂O, 0.85% NaCl, 0.5% SDS or 0.5% Triton X-100 were not significantly different. SDS-PAGE study demonstrated that protein components of 19.3 kDa were found specifically in Hanwoo and Holstein beef, but not in pork or chicken meat samples. This beef-specific protein component were still present after heating at 100°C for 30 min. ELISA study using the polyclonal antibody against heat-denatured (100°C for 30 min) beef-specific protein component demonstrated that titration was higher in heat-treated beef than in non-treated beef and OD value was higher than 0.3 at 1:32,000 dilution of the antibody. Also ciELISA study showed that strong competition was observed from 0.1 ug of beef per well, however, the antibody had weak but insignificant competition with pork or turkey meats, demonstrating that beef-specific antibody produced in the present study would be applied for qualitative and quantitative determination. Dot blotting study using beef-specific polyclonal antibody demonstrated that detection limit was approximately 10 ug/well. Although the sensitivity of dot blotting was lower compared with ELISA, dot blotting method would be applied for beef identification particularly

in outdoors because the method is rapid and easy of practical use.

4. Development of Systems for the Evaluation of Imported Beef

A. ELISA for the Identification of Frozen-Thawed Beef

B. Comet assay for the Identification of γ -Ray Exposed Beef

The size of domestic meat market, about 300~500 billion won a year, is so large but the circulation system is not sound in its structure. Especially, there are illegal sellings of imported meat product damaging the basis of domestic livestock farmers in retail markets. The imported meat product are on sale as domestic-produced meat product, and the imported frozen meat as chilled meat. With a aim of the establishment of order in the circulation of meat product, there have been several studies on the discrimination between imported and domestic meat products. For example, RFLP (restricted fragment length polymorphism) method was developed to detect the specificity in bovine species using DNA analysis. However, it has some limitations caused by the hybridization of domestic bovine genes with introduced genes foreign genes, and there is no practical analysis tool for this purpose at present. In this study, we tried to apply ELISA technique and Comet assay to develop a discriminating analytical method. We focused on the facts that the imported meat products have to be preserved for long time (frozen for 60-90 days shipping) and be frozen and thawed repeatedly, undergoing the denaturation of meat proteins and the damages on DNA molecules. Myosin, a meat protein, and its subfragments obtained by enzymatic hydrolysis were separated and purified. By immunizing a

rabbit with the purified myosin and its subfragments, the anti-myosin, anti-subfragments polyclonal antibodies were obtained for Ci-ELISA analysis. The immunoreactivities of freezing-preserved and freezing-thawing repeated meat samples were decreased in proportion to the freezing-preservation time and the number of freezing-thawing times. The established conditions for Ci-ELISA were suggested as being used in the discrimination of imported meat products from domestic ones. The DNA damage data on the meat samples showed by Comet assay were proportional to the refrigeration time until 3 days and the number of freezing-thawing times. It was found that the group pattern of damaged DNA molecules was more useful for the determination of 'meat history' than the direct index of DNA damage. It was concluded that the ELISA and Comet assay techniques used in this study have a significant potential possibility for the development of a practical method and the subsequent step to establish the more concrete conditions is needed to achieve that purpose.

CONTENTS

Summary	21
Chapter I. Introductory Chapter	
Section 1. Background and Importance of Research	35
Section 2. Research Trends	41
Section 3. Purpose and Scope of Research	45
Chapter II. Development of Systems for the Detection of Trace Vitamins	53
Section 1. Introduction	53
Section 2. Methods	58
Section 3. Results and Discussion	69
1. Biotin	69
2. Pantothenic acid	88
3. Vitamin D	95
Section 4. References	100
Chapter III. Development of Systems for the Speciation of Non-Meat Proteins	115
Section 1. Introduction	115
Section 2. Methods	118
Section 3. Results and Discussion	

1. Soybean Proteins	123
2. Milk Proteins	138
3. Egg Proteins	142
Section 4. References	159
Chapter IV. Development of Systems for the Speciation of Meat Proteins	187
Section 1. Introduction	187
Section 2. Methods	191
Section 3. Results and Discussion	196
1. Pork	196
2. Chicken meat	203
3. Beef	221
Section 4. References	232
Chapter V. Development of Systems for the Evaluation of Imported Beef	257
Section 1. Introduction	257
Section 2. Methods	261
Section 3. Results and Discussion	272
1. ELISA for the Identification of Frozen-Thawed Beef	272
2. Comet assay for the Identification of γ -Ray Exposed Beef	299
Section 4. References	312

목 차

요약문	3	
제 1 장 서 론		
제 1 절 연구개발의 배경 및 필요성	35	
제 2 절 국내외 연구개발현황	41	
제 3 절 연구개발의 목적 및 범위	45	
제 2 장 미량 비타민의 분석법 개발		53
제 1 절 서 설	53	
제 2 절 방 법	58	
제 3 절 결과 및 고찰	69	
1. Biotin의 신분석법 개발	69	
2. Pantothenic acid의 신분석법 개발	88	
3. 비타민 D의 신분석법 개발	95	
제 4 절 참고문헌	100	
제 3 장 비육류 단백질의 분석법 개발		115
제 1 절 서 설	115	
제 2 절 방 법	118	
제 3 절 결과 및 고찰		
1. 대두단백질의 분석법 개발	123	

2. 우유단백질의 분석법 개발	138
3. 계란단백질의 분석법 개발	142
제 4 절 참고문헌	159
제 4 장 원료육 단백질의 식별법 개발	187
제 1 절 서 설	187
제 2 절 방 법	191
제 3 절 결과 및 고찰	196
1. 돈육의 식별법 개발	196
2. 계육의 식별법 개발	203
3. 우육의 식별법 개발	221
제 4 절 참고문헌	232
제 5 장 수입육에 대응한 국내산 축육의 경쟁력 향상을 위한 분석기술 개발	257
제 1 절 서 설	257
제 2 절 방 법	261
제 3 절 결과 및 고찰	272
1. ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발	272
2. 육의 저장 중 DNA손상측정을 위한 Comet assay의 개발	299
제 4 절 참고문헌	312

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 배경 및 필요성

1. 연구의 배경

◇ 1990년 육제품이 수입자유화 됨으로써 국내 축산업이 위기를 맞고 있음. 즉, 수입육제품의 국내 시장은 20%이상이 점유되었으며, 1995년 하반기중 유통기한 연장 및 냉동 수입육의 유통이 허용됨에 따라 수입육제품의 가격이 국내 육제품에 비해 50~60%에 불과하여 국내 유통시장의 점유율이 1997년 이후에는 50%이상 차지할 것으로 예상됨.

◇ 국내산 생산육과 수입육이 차별화된다고 할지라도 현재와 같은 많은 물량의 수입육이 국내생산 축육으로 둔갑(1년 3,000~5,000억원) 판매된다면 가축의 생산농가의 수익은 유통업자들에게 돌아가게 되므로 우리나라의 축산농가의 경쟁력은 그 만큼 취약해지고 말 것임.

◇ 그러므로 수입 냉장 및 냉동육과 국내산 생산육의 신속한 판별방법의 개발을 통한 유통체계의 확립은 무엇보다 시급함.

◇ 이제까지 DNA의 Finger printer method 등을 통한 수입육과 국내 생산육의 특이한 DNA 밴드를 조사하여 그 판별을 하고자 하는 연구가 최근에 많이 진행되었으나 수입육이나 국내 생산육의 가축이 단일종이 아니므로 실제 이 방법을 실용화하기는 거의 불가능함.

◇ 다른 한편, 앞으로 축산물 수입개방은 소비자로 하여금 질적으로 우수

하며 다양한 외국의 많은 육가공제품을 접할 기회가 많게 될 전망이다.

◇ 이에 수입육제품과 국내제품의 실질적인 질적 품질검사인 이중축용검사(우육→돈육, 돈육→계육, 칠면조육, 계육→어육)와 우리 나라 고유식품인 흑염소탕도 유사한 맛을 가진 양고기등으로 불법대처되어 사용될 우려가 있음.

◇ 또한, 육가공 제품 등의 제조시 수분첨가를 향상시키는 이중 단백질(대두단백, 우유단백, 혈청단백)의 검사는 소비자의 경제적 불이익을 방지하고 무분별한 육제품 수입을 통제하며 국내 제품의 질적 향상을 도모할 것으로 예상됨. 대표적으로 다음의 예를 들 수 있음.

- * 육가공품 중에 함유된 원료육 (소, 돼지 등)의 함량미달
- * 육가공품중의 대두, 밀 등 식물단백질이나 다른 원료육의 혼용
- * 어린 가축용 대용유(젖대용품)중 우유성분의 함량 미달

◇ 이는 서구유럽에서는 육가공제품의 규격화내지 표준화를 위하여 법적으로 사용허용량을 엄격히 제한하고 있고 함량표시를 반드시 규정하고 있으며, 수시로 제품검사를 실시하는 것과 대조적임. 따라서 육제품의 가열변성된 단백질의 특이성과 그 문제점을 해결해야 할 연구가 필요함.

◇ 한편, 비타민은 사람이나 가축의 체내에서 생존에 필수적인 역할을 하는 영양소임. 그러나 농수축산물, 사료 또는 식품중에 함유되어 있는 비타민은 워낙 미량으로 존재하기 때문에 정확한 함량을 효율적으로 알아내기가 쉽지 않음. 따라서, 영양학적으로 그리고 사료의 효율성을 재고하기 위하여 새로운 비타민분석법의 개발이 요구됨.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

◇ 비타민은 식품이나 사료에 워낙 미량으로 존재하는 것이 많아서 종래의 분석법 (기기분석, Bioassay)으로는 검출감도가 낮거나, 까다로운 전처리 및 고도의 분석기술을 요하며, 많은 시간을 요함.

◇ 따라서 생물학적 특이반응을 이용하는 EPBA (Enzyme protein binding assay) 및 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Immunoassay)를 활용하여 효과적인 비타민의 분석법의 개발이 필요함.

◇ 한편, 유제품, 육제품 등의 축산물이나 그 가공품에 사용된 원료단백질의 식별은 킬달정량, 유당분석, SDS-PAGE, 물성분석 등의 방법으로는 불가능하며, 생물학적인 특이반응을 이용하여야 가능함.

◇ 아직까지 국내에는 단항제를 생산하여 축육 단백질 식별 방법이 실증적으로까지 매우 미흡한 상태이고 일반적으로 실험기간이 오래 걸리며 어려운 과제이기 때문에 선진국 독일에서도 국책의 사업으로 실시하고 있으나, 이번 계획안과 같이 종합적인 system 개발은 아직 전무한 실정임.

◇ 또한, 육가공품중에 첨가제로 사용된 값싼 비육류 단백질인 대두, 우유, 계란, 밀 단백질의 함량분석을 위하여도 면역분석법을 도입하여야 함.

◇ 다른 한편, 냉장육 수입이 자유화될 경우 유통기간을 연장하기 위해서 방사선 조사가 식육에도 적용될 수 있으므로 수입식육의 방사선 조사여부를 판별할 수 있는 방법이 필요함.

◇ 냉동·냉장육이 국내에 수입되어 국내산 축육으로 1년 3,000~5,000억 원 둔갑판매되나 이를 판별할 수 있는 간편한 방법이 현재 없으므로, 도축 후 변성이 빠른 육단백질의 변성정도를 쉽게 알 수 있는 면역분석 방법의 개발이 필요함.

◇ 국내산 및 수입 냉동육과 냉장육의 가격이 차별화될 때 냉동육을 해동시켜 냉장육으로 판매가 우려되나 이를 알아낼 수 있는 간편한 방법이 없음.

◇ Comet assay는 수입축산물 뿐 아니라 수입농산물의 방사선 조사 여부를 확인하는데 광범위하게 활용이 가능함.

◇ 이상과 같은 첨단분석기술의 개발에는 종합적인 생물공학기술이 요구됨.

나. 경제·산업적 측면

◇ 수입개방에 즈음하여 국내 식품산업 및 축산업에서 선진분석법을 활용하지 못하면, 이로 인한 직접 및 간접적으로 경제적 손실이 매우 커질 것으로 예상함. 유가공품이나 육가공품중에 표시된 원료를 사용하지 않거나 함량을 속이는 경우, 소비자의 경제적 피해를 초래하고 식품산업 발전을 저해하는 요인이 됨.

◇ 식품 및 위생검사에 있어서 육가공품 제조시 축종간의 판별은 생산자와 소비자간의 기본적인 신뢰도로써 국내에서도 원료의 함량이 표시와 다르거나 가짜를 사용하는 사례가 발생하고 있어 개인간은 물론 기업간에도

법적으로 분쟁의 조짐이 있어 사회적, 경제적 문제를 야기시키고 있음.

◇ 특히 육가공장에서는 제조원가를 절감하기 위하여 값싼 이종축육 또는 이종 단백질을 육가공제조시 첨가하여 제품의 질을 저하시키는 물론 소비자에게 경제적 불이익을 초래하는 경우가 많음.

◇ 냉장우육의 유통기한은 90일, 돈육은 50일이나 냉장육의 수출을 위해서는 위생적인 도축이나 방사선조사에 의한 살균이 필수적임 (일부국가에서는 허용되어 있음). 따라서 수입육에 대한 안정성확보 및 수입규제를 위하여 방사선조사 유무를 밝히는 분석법이 요구됨.

◇ 냉동육보다 육질이 우수한 냉장육의 유통을 정착 (육질의 차별화 --> 축산농의 소득증대)시켜기 위하여는 생산 및 유통 시스템의 확립과 아울러, 해동한 냉동육을 냉장육과 구분할 수 있어야 함.

◇ 즉, 국내에서는 대부분의 육이 동결상태로 판매되고 있는데, 이로 인한 상품가치 저하 (년간 약 3,000억 이상)를 방지할 수 있는 숙성육 유통을 이루기 위하여 냉동육의 판별법이 개발되어야 함.

◇ 또한, 한우육을 냉장에 의하여 숙성해야 진정한 의미의 한우육 「브랜드」 화를 실현할 수 있는데, 이를 위하여도 냉동, 냉장육의 구별법이 뒷받침되어야 함.

◇ 선진외국에서 개발된 일부의 첨단분석법은 키트화되어 판매되고 있으며, 날로 증가하는 분석업무에 부응하기 위하여 이를 수입하여 사용할 경우 외화의 유출이 예상된다.

◇ 생물학적 특이성을 이용한 첨단분석방법을 개발하여 활용하면 분석의 효율화 및 간접적인 분석비용을 절감할 수 있음.

다. 사회·문화적 측면

◇ 육가공품 제조시 축종간의 판별은 서구 유럽에서 매우 중요시하며 특히 독일의 경우 수의 사의 수행과정중의 하나로써 항상 중요시 되어왔음.

◇ 국내에서도 WTO체제의 출범과 더불어 무분별한 축산물의 수입개방에 대처하고 육제품의 표준화 내지 규격화를 통한 제품의 향상 및 소비자의 경제적 불이익을 방지하는데 일익을 담당할 수 있도록 축종간의 이종단백질을 구별 정량하고, 또한 대두단백 등 비육류단백질의 검사도 가능하도록 하여 실질적인 제품의 규격화 내지 표준화를 달성하여야 함.

◇ 식품에 함유된 미량비타민의 정확한 분석은 영양학적, 국민건강적 차원에서 매우 중요함.

◇ 사료에 함유된 비타민의 분석은 사료의 효율을 증진시키는데 필수적인 요소임.

◇ 최근 알레르기환자가 날로 증가하고 있으며, 식품성분중 특정 단백질이 원인이 되는 알레르기에 대응하여 그 원인물질(allergen)의 함유유무를 밝힐 수 있는 분석법이 확립되어야 알레르기환자의 식이를 조절할 수 있음. 특히 가공식품중에는 여러 성분이 혼합되어 있어 특정 allergen 검출이 매우 어려움.

◇ 본 연구에서 개발하고자 하는 첨단분석방법은 아직 국내에서 초기 개

발단계이어서 현장에서의 분석에 활용되지 못하고 있으므로 국가적인 차원에서 조속히 개발하여 활용할 필요가 있음.

◇ 방사선조사육의 수입에 대비한 분석법을 확립함으로써 수입축산물의 안전성을 확보해야 함.

제 2 절 국내외 연구개발현황

1. 외국의 경우

◇ Bioassay는 대부분의 미량비타민 분석에 활용가능하나, 분석시간이 길고 (2-3일가량) 숙련도를 요하며 정확성이 떨어짐.

◇HPLC에 의한 기기분석은 복잡한 전처리를 요하며, 검출감도가 낮거나 경우에 따라서는 검출이 불가능함.

◇ ELISA나 EPBA는 항체 및 vitamin binding protein에 의한 생물특이반응을 이용함으로써 간편, 신속, 정밀하게 분석할 수 있는 방법으로 근년 개발하였으나, 교차반응이나 시료의 전처리 방법 등 일부 개선해야 할 문제가 있음.

◇ 국내에서는 이에 대한 연구가 극히 미비함. 다만, 저분자물질(hapten)의 검출법으로서 ELISA를 활용한 연구가 본 연구진에 의하여 다수 이뤄져 왔으므로, 이 기술을 활용하면 비교적 단시간내에 본 분석법을 확립할 수

있음.

◇ 이종단백질의 식별 (육류 및 비육류 단백질)의 식별에 대한 연구는 독일, 호주, 영국 등에서 활발히 진행되어 왔으며 최근 상업적인 검출kit가 판매되고 있음.

◇ 육류 등 식품의 가공시 증량제나 결착제로 사용되는 대두, 밀, 우유, 계란 등의 비육류 단백질은 ELISA에 의하여 양호한 검출이 가능함이 보고되고 있음.

◇ 일부 단백질은 단클론항체를 이용하여 매우 특이적으로 검출이 가능하나, 가열한 단백질의 경우에는 정확한 검출 및 정량이 어려운 경우가 있어, 새로운 항체생산 및 분석조건의 확립을 통하여 효과적인 방법의 개발을 요함.

◇ 냉동육 및 냉장육의 판별은 아직 세계적으로 그 분석법이 잘 확립되어 있지 않으나, 최근 냉장, 냉동시 myosin단백질이나 DNA의 변성도를 조사하는 방법 (ELISA 및 Comet assay)이 독일을 중심으로 연구되고 있음.

◇ 그중에서 Comet assay는 방사선조사육이나 냉동육의 DNA손상을 분석하는 방법으로, 육조직의 DNA를 염색하고 그 image를 분석하는 새로운 기술임.

◇ Comet assay는 조사(radiation)식품의 판별방법으로 최근에 Delincee(1994)는 개발하여 좋은 결과를 얻었음. 아직 국내에서는 방사선 조사가 식품 저장방법으로 허용되지 않으나 네덜란드를 비롯하여 많은 나라에서 식품에서 이들의 사용이 허용되고 있어 조사(radiation)된 농산물

이 국내에 수입될 것이지만 이러한 조사식품을 판단할 수 있는 간편한 방법은 아직 국내에서 제대로 연구되거나 활용된 예는 없음.

◇ 그간 국내에서는 수입육을 전자 현미경 관찰을 통해 판별할 수 있는 방법이 강등(1992)에 의해서 연구되었으며, 또한 한등(1993)에 의하여 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)방법이 연구되고 있으나 southern blotting상에서 한우의 특이 band를 찾는다고 할지라도 수입육의 품종이 다양하고 한우의 순수혈종에만 적용할 수 있으므로 그 적용이 불가능하며 또한 현미경상의 관찰도 주관적인 판단에 치우칠 수 있어 실제 적용에 한계가 있음.

◇ 외국에서는 동결육과 냉장육이 가격이 차별화되어 냉동육을 해동시켜 냉장육으로 둔갑 유통되는 것을 방지하기 위하여 Hamm(1982)과 Gottesmann, Hamm(1984)에 의하여 동결육이 해동될 때 미토콘드리아 membrane의 파괴에 의하여 이들 속에 존재하는 Ascontase와 Fumarase 등이 해동 juice 속에 유출된다는 사실에 착안하여 이들의 activity를 조사하여 동결·해동육을 판별하는 방법을 개발했으나, 이 방법으로는 일반 우육도 짧은 기간 동결·해동되어도 이들 효소의 activity가 높기 때문에 냉동육을 해동한 육인지는 알 수 있지만 수입육인지를 판별하는데 적용할 수 없음.

◇ 따라서 동결이나 냉장기간이 수입육의 경우 길어지게 되므로 이 기간중 단백질의 변성정도를 DSC(Differential Scanning Calorimetry)를 이용한 연구가 Parket al(1989), Beiken et al(1989)하에 진행되었으나 동결해동육과 신선육을 판단할 수 있을 정도로 정확하지 않음.

◇ 본 연구의 공동연구자인 신현길교수는 myosin의 열변성을 ELISA로 측정

한 바 좋은 결과를 얻었으며(박,1992), 동결 기간중 myosin의 변성을 확인하였다(신등,1993).

◇ 따라서 ELISA방법을 통해서 기간이 오래된 동결육이나 동결해동육을 쉽게 판별할 수 있는 방법을 개발하여 현장에서 적용할 수 있을 것으로 예측함.

2. 국내의 경우

◇ 국내의 경우 육가공분야에서 대두단질의 첨가에 대한 검출법으로 ELISA를 이용한 연구보고가 한 두 편있을 뿐이고, 육단백질의 식별에 ELISA를 활용한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

◇ 최근에 혈액시료로부터 DNA 분석기술을 이용해 우리나라 고유의 식육자원인 한우품종에 국한하여 특이적인 DNA 표지인자가 본 연구팀과 일부 연구자들에 의해 보고된 바 있으나 도체후 원료육이나 가공육제품의 축육을 대상으로 면역학적 방법, 전기영동법 및 분자생물학적 방법의 첨단기술을 이용한 축종 및 육종감별에 관한 기술개발은 현재까지 기초적인 연구조차 전무한 실정이다.

◇ 저장육의 평가에 관한 그간 국내에서는 수입육을 전자현미경 관찰을 통해 판별할 수 있는 방법등이 강 등(1992)에 의하여 연구되었으며, 또한 한 등(1993)과 신 등(1992)에 의하여 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 방법이 연구되었으나 Southern blotting상에서 한우의 특이 band를 찾는다고 할지라도 수입육의 품종이 다양하고 한우의 순수 혈통에만 적용할 수 있으므로 그 적용에 어려움이 있으며 또한 현미경상의 관찰도 주관적인 판단에 치우칠수 있어 실제적인 적용에 어려움이 있다.

◇ 한동대 연구팀에서는 그간 육단백질의 50%를 차지하는 myosin의 변성도를 ELISA법으로 측정하였던바, 가열에 의한 변성(신 등, 1994)과 동결에 의한 변성(신 등, 1994)을 쉽게 평가할 수 있었다. 특히, 동결·해동을 1회 실시할 경우는 myosin의 변성이 거의 일어나지 않으나 2회의 경우 45 - 50%, 그리고 3회의 경우 60%정도의 변성정도를 측정할 수 있어 대부분의 수입육이 동결→해동→재동결→판매 등의 과정을 거치게 되므로 수입육과 국내 생산육의 판별에 좋은 자료를 제공할 수 있으리라 본다.

제 3 절 연구개발 목적 및 범위

1. 목 적

종래 어렵거나 효율성이 낮은 분석의 문제를 해결하거나 보완할 수 있도록 생물특이반응 등을 이용한 다음의 첨단분석법을 개발함.

- ◇ 사료 및 식품중의 미량비타민 신분석법 개발
- ◇ 식품중 원료단백질 종류의 식별법 개발
- ◇ 육가공품 중 원료육의 판별법 개발
- ◇ 해동우육과 냉장우육을 구분할 수 있는 분석법 개발
- ◇ 방사선 조사육의 식별법 개발

2. 범 위

가. 미량 비타민의 분석법 개발 (한국식품개발연구원)

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용 및 범위
1 차 년도 (1996)	*비타민 Biotin의 신분석법 개발	-Biotin-KLH의 준비 -Biotin-HRP의 준비 -면역 및 특이항체의 생산 -추출조건의 검토 -ELISA조건의 확립 -EPBA조건의 확립 -분석간 상관성 검토
2 차 년도 (1997)	*비타민 Pantothenic acid 신분석법 개발	-Pantothenic acid-BSA의 준비 -면역 및 특이항체의 생산 -추출조건의 검토 -ELISA조건의 확립 -Pantothenic acid-HRP의 준비 -미생물법 조건의 확립 -분석간 상관성 검토
3 차 년도 (1998)	*비타민 D의 신분석법 개발	-비타민D-BSA의 준비 -면역 및 특이항체의 생산 -특이항체의 정제 -비타민D-HRP의 준비 -비타민D의 ELISA 조건 확립 -추출조건의 검토 -분석간 상관성 검토

나. 비육류 단백질의 분석법 개발 (한국식품개발연구원)

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1 차 년도 (1996)	*대두단백질의 검출법 개발	<ul style="list-style-type: none"> -대두단백질의 분리 -특이항체의 생산 -ciELISA조건의 확립 -특이항체의 정제 -항체-HRP의 준비 -cdELISA조건의 확립 -추출조건의 검토 -분석효율의 검정
2 차 년도 (1997)	*우유단백질의 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> -우유단백질의 분리 및 면역 -특이항체의 생산 -ciELISA조건의 확립 -특이항체의 정제 -항체-HRP의 준비 -sandwich ELISA 조건 확립 -추출조건의 검토 -분석효율의 검정
3 차 년도 (1998)	*계란단백질의 검출법 개발	<ul style="list-style-type: none"> -계란단백질의 분리 및 면역 -특이항체의 생산 -특이항체의 정제 -항체-HRP의 준비 -계란단백질의 ELISA 조건 확립 -추출조건의 검토 -분석효율의 검정

다. 원료육 단백질의 식별법 개발 (상지대학교)

구분	연구 개발 목표	연구 개발 범위
1 차 년도 (1996)	1. 원료육의 지표단 백질의 선택	- 돈육의 육단백질의 추출 및 조성성분의 분석 - SDS-PAGE에 의한 지표단백질의 검증 및 선별
	2. 가열 계육의 구 성단백질의 변성도 검증	- 가열 및 비가열 돈육 성분의 비교분석 - 가열육제품중의 돈육 검색 - 투기에 의한 변역
	3. 항혈청을 이용한 ELISA System의 확 립	- Rabbit anti-chicken IgG의 분리 및 정제 - 가열 및 비가열육에 대한 역가검증법 확립 - ELISA를 이용한 육제품중의 돈육 함량 평가방법의 확립
2 차 년도 (1997)	1. 원료육의 지표단 백질의 선택	- 닭의 육단백질의 추출 및 조성성분의 분석 - SDS-PAGE 및 lectin staining을 통한 지표단백질의 검증
	2. 가열 육제품의 원료육 측정 System 의 개발	- 가열 및 비가열 한우육의 구성단백질의 비교분석 - 가열육제품중의 닭고기 검색
	3. 항혈청을 이용한 ELISA System의 확 립	- 변역 - Affinity chromatography에 의한 anti-rabbit IgG의 정제 - 가열 및 비가열육의 ELISA System을 이용한 단백질 변성도 측정 - ELISA를 이용한 육제품중의 닭고기 함량 평가방법의 확립 - Dot-blotting를 이용한 평가모델의 검증
3 차 년도 (1998)	1. 원료육의 지표단 백질의 선택	- 한우육의 육단백질의 추출 및 조성성분의 분석 - SDS-PAGE 및 lectin staining을 통한 지표단백질의 검증
	2. 가열 육제품의 원료육 측정 System 의 개발	- 가열 및 비가열 한우육의 구성단백질의 비교분석 - 가열육제품중의 한우육 검색
	3. 단일 항체의 선 발 및 원료육 판별 법의 확립	- ELISA 및 Immunoblotting에 의한 Screening 및 항체 의 선발 - 단일 항체를 이용한 한우육 및 기타 축종별 원료육의 판별법 개발 - 육제품중의 한우육 함량 측정법의 개발

라. 수입육 판별 및 분석기술 개발 (한동대학교)

과제	연구개발범위	
ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발	1. Myosin 및 그 subfragments의 분리와 항체의 생산 2. 우육의 냉장 및 동결처리에 따른 변성도 측정 3. 수입육에 대한 평가	<ul style="list-style-type: none"> • Myosin의 분리 • Myosin으로부터 myosin heavy chain 및 light chain의 분리 • 효소적 분해에 의한 myosin heavy chain으로부터 subfragments의 분리 및 정제 • Myosin 분자와 그 subfragments의 면역 및 항체 생산 • 항체의 분리 및 정제 • Ci-ELISA 조건의 확립 • Inter 및 intra assay에 의한 신뢰성 검정 • 냉장저장에 의한 myosin 분자의 변성도 측정 • 동결저장에 의한 myosin 및 그 subfragment의 변성도 측정 • 해동 및 냉동 반복처리에 의한 변성도 측정 • 시중에서 유통되고 있는 수입육의 검색
육의 저장중 DNA손상 측정을 위한 Comet assay법의 개발	1. Comet assay법의 확립 2. 우육의 처리방법에 따른 DNA 손상도 조사 3. 수입육과의 비교 4. ELISA 법과 Comet assay를 이용한 육의 변성정도의 추정	<ul style="list-style-type: none"> • 육조직으로부터 DNA 핵체의 분리 • Lysis 방법의 설정 • Electrophoresis 방법의 설정 • Tail length/moment 결과의 분석 • 냉장저장에 의한 우육의 DNA 손상 정도의 검사 • 동결기간에 따른 우육의 DNA 손상 정도의 검사 • 동결 및 해동 반복처리에 의한 DNA 손상 정도의 검사 • 방사선조사량에 따른 DNA 손상 정도의 검사 • 국내산 신선우육의 DNA 변성 정도 검사 • 수입우육에 대한 DNA 변성 정도의 평가

여 백

미량 비타민의 분석법 개발 (세부과제-1)

Development of Systems for the Detection of
Trace Vitamins

1998. 12. 20

연구기관

한국식품개발연구원

여 백

제 2 장 미량 비타민의 분석법 개발

제 1 절 서 설

항체나 비타민 결합물질을 이용하여 식품중의 pantothenic acid, biotin, folate, B6 및 B12를 분석하는 방법이 근년 외국에서 개발되고 있다. 이는 96-well microplate를 이용함으로써 많은 수의 시료를 동시에 분석하기에 용이하며, 한 성분에 대하여 매우 특이적으로 분석이 가능할 뿐 아니라, 같은 종류의 비타민을 분석할 수도 있다. 항체를 이용한 ELISA format은 전자(특정 비타민)의 분석에 유용하며, EPBA방식은 후자의 분석에 유용하다.

비타민은 미량으로 사람이나 동물의 여러가지 생리 기능을 조절하며 완전한 물질 대사가 일어날 수 있도록 하는 유기화합물이다. 1911년 폴란드의 Funk가 쌀겨와 효모로부터 각기병을 치유할 수 있는 유효성분을 결정으로 분리하여 vitalamin의 의미로서 vitamin이라고 명명한 이후, 동물 실험에 의하여 결핍증에 대한 연구가 계통화되면서 수용성 및 지용성 비타민으로 구분되어 현재까지 약 30 여종의 비타민이 발견되었다 (Friedrich, 1988).

수용성 비타민의 하나인 biotin은 1926년 Boas에 의하여 처음으로 발견되었다. 흰쥐에 생란(生卵)을 다량 투여하면 특유의 피부염과 탈모현상을 일으키지만 열에 응고된 난백(卵白) 또는 효모를 투여하면 그 증상이 일어나지 않았으므로, 이러한 증상을 예방하는 인자가 있다는 것이 알려졌다. 그 후 1936년에 Kögl이 난황(卵黃)으로부터 이 인자를 결정상태로 분리하여 biotin 이라 명명하였으며, 1939년 György는 효모에서 얻은 물질을 독일어 Haut(피부)의 첫글자를 따서 비타민 H라 하였고 biotin과 동일한 물질임을 발표하였다. 또 1942년 du Vigneaud는 biotin의 구조를

결정하고 이의 명칭을 coenzyme R로 명명하였다 (Bonjour, 1991 ; Friedrich, 1988).

Biotin은 여러 가지 탄산고정화반응 (carboxylation)에 관여하는 조효소 (coenzyme)로서, 생체내의 각종 대사계를 조절한다. 즉, isoleucine 과 leucine 대사계와 탄수화물 및 지방산의 생합성에 중요한 조효소로 작용하며 (Friedrich, 1988 ; Sweetman, 1981 ; Wolf and Feldman, 1982), 간접적으로는 지질대사와 탄수화물대사, 성호르몬의 생산, 골 (骨)의 성숙, 그리고 항체생산 등에도 관여하고 있다 (Bannister, 1976 ; Benditch and Cohen, 1988 ; Marshall *et al.*, 1985).

인체에서의 biotin 섭취량에 대한 상세한 보고는 없으나, 장내세균에 의하여 필요량이 합성되어 이용되며 대부분의 식품에 미량으로 존재하므로 부족되지는 않는 것으로 알려져 있다 (Bonjour, 1985 ; Miller, 1982 ; Oshugi *et al.*, 1990 ; Wilson and Lorenz, 1979). 그러나 설파제 등의 항생제를 복용할 경우는 장내세균의 생육이 저해되며, 이에 따라 biotin의 생합성이 억제되므로 결핍증이 일어날 수 있다. 또 생란의 난백을 다량으로 동물에 섭취시켰을 때에도 biotin의 결핍증인 난백장애 (egg white injury)가 일어난다 (Bonjour, 1977 ; Foldin, 1990). 랫드 (rat)에서는 성장이 정지되고 입이나 눈 등에 염증이 생기며 눈 주위의 탈모 (spectacle eye condition) 및 지루성 (脂漏性) 피부염 등의 결핍증이 일어나고 심한 경우 피부출혈이 일어나 사망하게 된다. 사람의 경우에는 피로감과, 안면창백증, 피부염, 근육마비 등의 결핍증세를 보이며 또한 여러 가지 선천성 질환 (inborn error)과 영유아의 돌연사 (infant sudden death)의 원인 중의 하나인 것으로 보고되고 있다 (AAP, 1976 ; Baker, 1985 ; Hood, 1980 ; Johnson, 1980). 그러므로 미국의 경우에는, 성인에 있어서 biotin의 1일 섭취 요구량을 100-200 μg 으로 규정하고 있다 (RDA, 1989).

Biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$, hexa-hydro-2-oxo-1H-thienol [3,4-d]-imidazole-4-pentanoic acid)은 분자량이 224.3인 저분자의 물질로 그 구조는 Fig. 1-1에 나타난 바와 같이 요소와 비슷한 구조의 imidazol 환과 유황 (S)을 가지고 있는 thiophene 유사 화합물이 결합한 것이다 (Machlin, 1990). 용점이 228-232 °C인 무색 결정으로, 수용액은 열에 대하여 매우 안정하다. 알칼리에 대해서도 비교적 안정하나 강한 산과 알칼리로 오래 가열하면 분해된다.

한편 여러 종류의 biotin 유사 화합물들이 미생물에 의해 생산되거나 화학적으로 합성된다. Biocytin은 biotin의 측쇄에 펩타이드 (lysine부)를 갖고 있는 결합형으로서 미생물과 동물체내에서 biotin으로 전환되어 동일한 효과를 나타낸다. Biocytin은 강산이나 강알칼리에서 고온, 가압 조건으로 처리하면 가수분해되어 biotin과 lysine으로 분리된다. Biotin 분자 내의 유황 대신에 산소나 탄소원자가 치환된 desthiobiotin (또는 oxybiotin)은 미생물 특히 유산균에 있어서 biotin과 동일한 효과를 보인다 (Bonjour, 1991 ; Finglas, 1986 ; Moll, 1986).

Biotin은 식품이나 조직 중에서 단백질과 결합되어 있기 때문에 분석하기가 쉽지 않으므로 대부분의 식품에 있어서 biotin의 함량에 대한 정확한 정보가 적고 식품 성분표에도 항목이 나타나있지 않다 (RDA, 1989 ; 한국인의 영양 권장량, 1989 ; 식품 성분표, 1991). 따라서 영양학적인 측면이나 임상적인 연구 등이 미흡한 실정이며, 최근에 영양학적 표식이나 정확한 성분 분석표의 필요성이 증대되면서 신속하고 정확하며 재현성 있는 biotin의 분석방법이 요구되고 있다.

HPLC (high performance liquid chromatography)에 의한 기기분석으로 biotin을 측정하고자 하는 연구가 많이 진행되었으나, 검출감도가 낮아서 식품 시료에 적용하는 것은 적절하지 않았다 (Chastein *et al.*, 1985 ; Desbene *et al.*, 1983 ; Henz, 1995 ; Pollesello and Rizzolo, 1990 ; Robert, 1990). 그러므로 *Lactobacillus plantarum*을 이용한 미생물 분

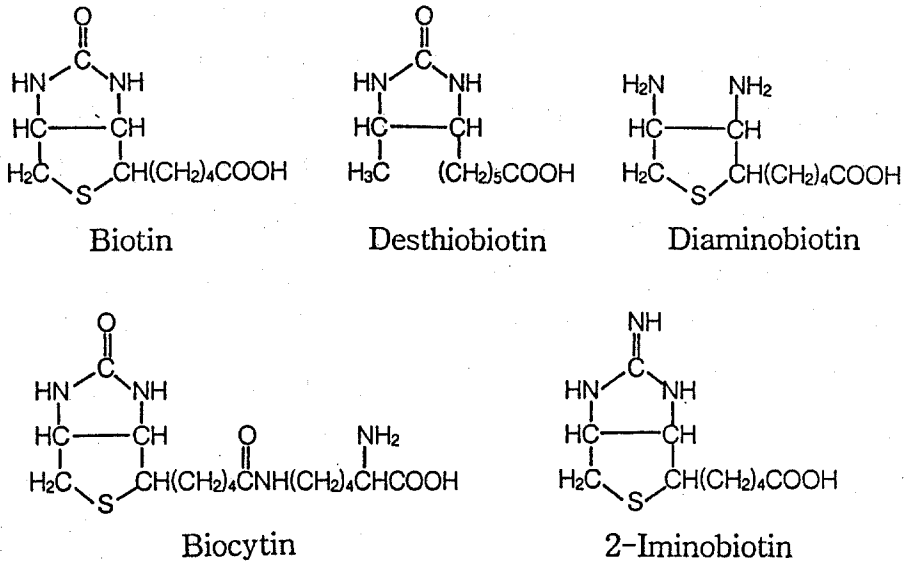
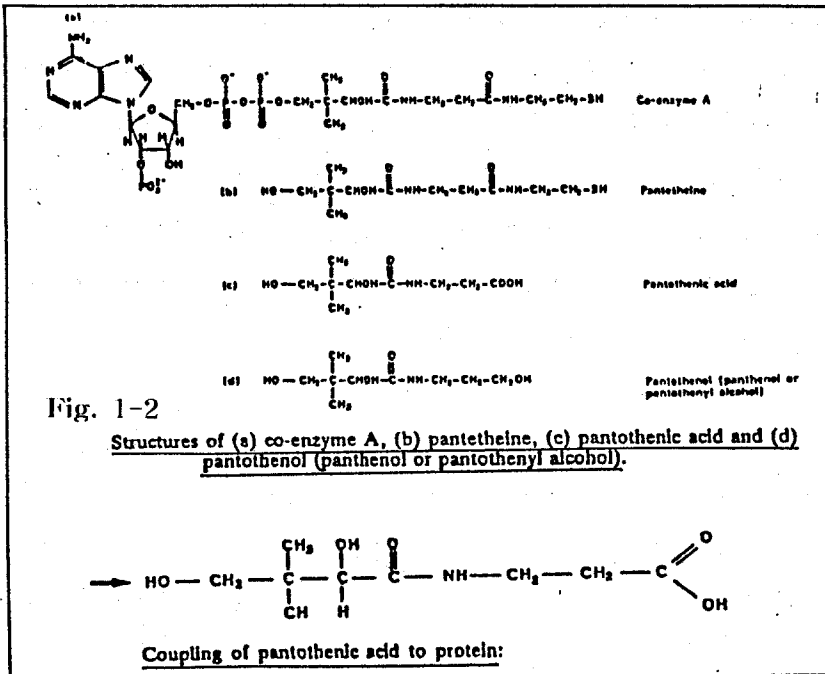


Fig. 1-1. Structure of biotin derivatives



석법 (microbiological assay; MBA)이나 방사성 동위원소를 이용한 방사선 면역분석법 (radioimmuno assay; RIA)이 현재까지 주로 이용되어 왔다 (Favell, 1990 ; Guilarte, 1985 ; Hoppner and Lampi, 1987 ; Lumley, 1990 ; Odunfa, 1986). 그러나 MBA의 경우는 biotin 이외에도 biocytin과 desthiobiotin에 대하여 반응을 보이는 문제가 있으며 (Haarasilta, 1987 ; Moll and Shive, 1986), 올레인산 (oleic acid)과 같은 불포화 지방산에 대하여도 반응을 보이므로 정확성이 떨어지는 것으로 알려져 있다 (Hudson, 1984). 또한 분석 시간이 길고, 숙련도를 필요로 하며, 시료중에 함유된 분석 방해물질을 제거하기 위해 복잡한 전처리 과정을 거쳐야 하는 단점이 있다. RIA는 고가의 장비가 필요할 뿐만 아니라 방사성물질의 안전성과 폐기물 처리 등의 문제 때문에 식품에 적용하는 것은 적합하지 않은 것으로 여겨지고 있다 (Caryn, 1992 ; Hood, 1975, 1977 ; Livanlou, 1987).

이러한 문제점들을 해결하기 위하여, biotin에 특이적인 항체를 생산하여 항원-항체반응의 면역기법을 이용하는 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 또는 biotin 결합 단백질을 이용하는 효소-단백 결합분석법 (enzyme-protein binding assay; EPBA)에 의하여 biotin을 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 하는 연구가 시도되고 있다 (Finglas and Morgan, 1986 ; Lee *et al.*, 1990 ; Vander- laan, 1991).

다른 한편, pantothenic acid는 free form, 또는 coenzyme A로서 결합형으로서 자연계에 널리 존재한다. Pantothenic acid 및 analogue의 구조를 Fig. 1-2에 나타내었다. 미생물에 의한 분석(Bioassay)은 비타민의 이중 추출로 결합형을 유리시킨 후, *Lactobacillus plantarum*을 이용하고 있다. RIA의 보고에서 특이성, 감도, 미생물법과의 상관성에서 좋은 결과를 보이며, ciELISA도 미생물법과 높은 상관성을 나타냄이 보고된 바 있다.

비타민 D의 면역분석법 개발에 관한 연구보고는 국내외에서 전혀 없으나 HPLC에 의한 그 분석법이 까다로워서 실제로 식품이나 사료중의 비타민 D분석에 어려움이 많은 실정이다. 비타민 D 및 그 관련물질의 구조를 Fig. 1-3에 나타내었다.

현재까지 국내에서는 단지 곰팡이 독소 및 항생물질을 검출하기 위하여 ELISA를 개발하고 적용한 보고가 있었으나 (Shon *et al.*, 1992, 1996), 식품중에 존재하는 비타민을 분석하기 위해 ELISA나 EPBA를 활용한 예는 아직 없었다.

그러므로 본 연구에서는, ELISA 및 EPBA 등의 생물 특이적 기법 (biospecific method)을 이용하여 신속하고 간편하게 비타민 (biotin, pantothenic acid, 비타민 D)을 분석할 수 있도록 우수한 특이항체를 생산하고 분석 조건과 시료의 추출조건을 최적화함으로써 실용화의 기초를 마련하고자 하였다.

제 2 절 방 법

1. 재 료

Biotin과 biocytin, desthiobiotin, 2-imminobiotin 등의 biotin 유사 비타민, pantothenic acid와 그 유사구조, 비타민 D와 관련물질 및 bovine serum albumin (BSA), goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, NHS-LC-biotin과 HABA (4-hydroxybenzene-2-carboxylise), 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolidine-sulfonic acid) (ABTS) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였고, keyhole limpet hemocyanin (KLH), Freund's complete adjuvant와 in- complete adjuvant, biotin-HRP와

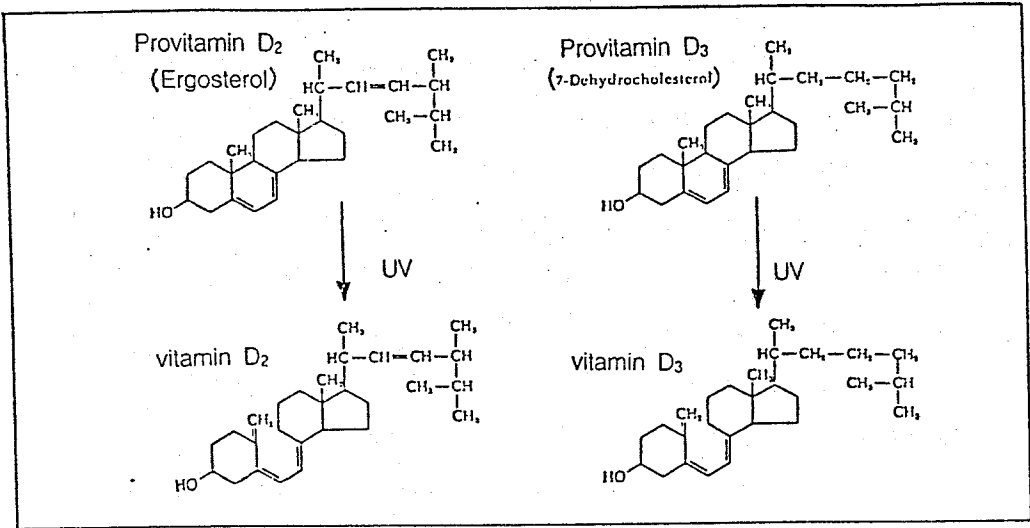


Fig. 1-3. Structure of Provitamin D and vitamin D.

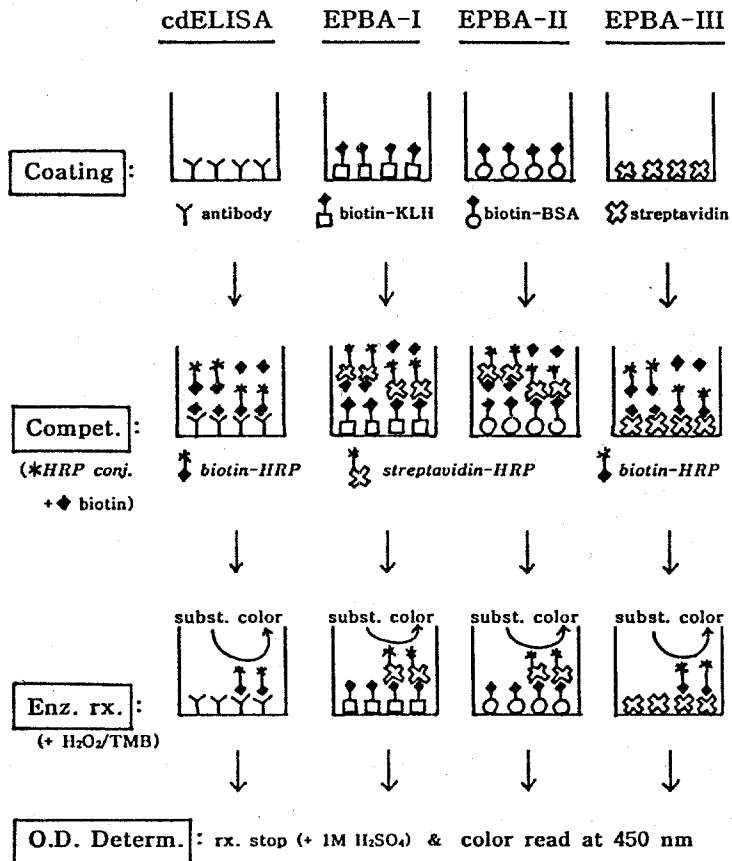


Fig. 1-4. Schematic procedure of cdELISA and EPBA's for biotin.

streptavidin-HRP, 단백질 정량용 micro BCA kit (#23235), 항체정제용 protein A column (Immunopure plus IgG purification kit, #44679)과 5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB)는 Pierce 사로부터 구입하였으며, 기타의 시약은 GR급 이상의 것을 사용하였다. 미생물 분석에 사용한 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014는 한국식품개발연구원으로부터 분양 받았고 Lactobacilli broth와 biotin assay media는 Difco 사에서 구입하였다. 실험동물로는 New Zealand White 웅성 토끼를 삼육실험동물연구소 (경기도 평택시)에서 구입하여 사용하였다.

Microtiter plate는 Nunc 사의 Maxisorp (#446612)을 사용하였으며, microplate reader는 Molecular Devices 사의 THERMO-max™을 이용하였다. 흡광도의 측정은 Jasco V-500 UV-Vis spectrophotometer를 이용하였다.

2. Biotin 분석법개발 방법

가. 특이항체의 생산

KLH (keyhole lymphet hemocyanin)를 carrier protein으로 하고 여기에 biotin을 공유결합시킨 biotin-KLH를 준비하였다. 이 conjugate 500 μ g을 동량의 Freund's complete adjuvant와 섞어 유탁액을 만들어 토끼에 피하주사하였다. 이후 2 - 3주간격으로 수 차례 추가면역하였다. 단 이때에는 Freund's incomplete adjuvant를 사용하였다. 매번 면역 1주후에는 토끼의 귀정맥으로부터 채혈하여 항혈청을 분리하였으며, 이로부터 protein A column 등을 이용하여 항체를 정제하였다.

나. 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay)

항체의 역가는 비경합적 ELISA에 의하여 측정하였고, biotin 분석을 위한 ELISA는 경합적 직접법(competitive direct ELISA; cdELISA)에 의하였다 (Fig. 1-4). 즉, microplate에 특이항체를 2 μ g/ml의 농도로 coating buffer (0.02M Tris buffer 0.15M NaCl,

0.05% Tween 20, pH 9.0)에 용해하고 각 well당 100 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하고, 3회 세척후, biotin과 biotin-HRP conjugate의 1:1 혼합액을 1시간 처리한 후, 기질용액 (H_2O_2 /TMB)을 30분 처리후 1M H_2SO_4 를 첨가하여 반응정지후 발색의 정도를 microplate reader로 450nm에서 측정하였다.

다. EPBA (enzyme protein binding assay)

(1) Biotin-KLH와 streptavidin-HRP conjugate를 이용한 EPBA: 이 방법은 위의 ELISA와 유사한데, 기본적으로 특이항체대신에 biotin-KLH를 coating하였고 biotin-HRP대신에 streptavidin-HRP을 결합반응에 사용한 것이다 (Fig. 1-4).

(2) Biotin-LC-BSA와 streptavidin-HRP conjugate를 이용한 경우: 이 방법은 바로 위의 경우와 거의 같다. 다만, biotin-KLH대신에 biotin-LC-BSA를 coating하였던 점만 다르다 (Fig. 1-4).

(3) Streptavidin과 Biotin-HRP conjugate를 이용한 EPBA: 이 방법은 위의 ELISA와 유사한데, 기본적으로 항체대신 streptavidin을 사용하는 점만 다르다 (Fig. 1-4).

라. 교차반응 (cross-reactivity)

각 농도별로 희석한 biotin analogue들 (biocytin, desthiobiotin, 2-iminobiotin, diaminobiotin)을 D-biotin대신에 사용하여 cdELISA 및 EPBA를 행하였다. 교차반응율은 항biotin항체 및 streptavidin에 대한 biotin-KLH의 결합을 50% 저해하는 biotin 농도를, biotin-KLH의 결합을 50% 저해하는 biotin analogue의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다. 또는, biotin-KLH (biotin-LC-BSA)에 대한 streptavidin-HRP의 결합을 50% 저해하는 biotin농도를, streptavidin-HRP의 결합을 50% 저해하는 biotin analogue의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

마. 미생물법 (microbiological assay: MBA)

AOAC method에 의하여 행하였는데, Lactobacilli broth에서 사전 배양한 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014의 균체를 biotin이 들어있는 assay tube에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. Biotin 함량은 660nm에서 O.D. 측정에 의하여 구하였다.

바. 시료의 조제

시료의 종류에 따라 다음과 같이 전처리하고 wash buffer로 적당히 희석하여 분석에 사용하였다.

(1) 우유

1 ml의 우유에 동량의 citrate buffer를 넣고, 1% EDTA 1 ml, 1% glutathione 0.1 ml, 2%의 papain 0.4 ml을 넣고 90분간 57°C의 수조에 방치한 다음, 2.4 ml의 citrate buffer를 첨가하고 autoclave (121°C, 10분)하였다.

(2) 후레이크

5 g의 후레이크 (flake)를 균질화 (homogenization)시킨 후 50ml의 증류수로 희석하고 5분간 초음파처리한다. 상온에서 20분간 교반후 원심분리 (6,000xg, 10분)하고 상징액에 carrez I (0.36M KFe(CN).3H₂O) 0.5ml과 carrez II (1.04M ZnSO₄·7H₂O) 0.5ml을 넣어 반응시킨 다음 다시 원심분리하여 얻은 상징액에 증류수를 첨가하고 전량이 25ml 되도록 하였다.

(3) 쥬스

쥬스를 원심분리하여 입자를 제거한 다음 10ml을 취하여 20ml의 증류수로 희석하고 pH를 4 - 6 (1N NaOH)으로 조정후 전량을 50ml로 하였다.

3. Pantothenic acid 분석법개발 방법

가. 편역원 제조

(1) Pantothenic acid-BSA (bromoacetyl chloride method, BAC):

BSA(Bovine Serum Albumin)에 pantothenic acid을 공유결합시킨 pantothenic acid-BSA을 준비하였다 (Fig. 1-5). 즉, pantothenic acid에 bromoacetyl chloride를 반응시켜서 생성된 bromoacetyl pantothenic acid와, urea로 변성시키고 dithiothreitol를 처리하여 disulfide결합을 -SH로 환원시킨 BSA를 반응시켰다.

(2) Pantothenic acid-BSA (periodate oxidation method): 다른 한편 Periodate oxidation방법에 의한 면역원도 제조하였다 (Fig. 1-6). 먼저 glycidol을 pantothenic acid의 primary alcohol group과 반응시켜 근접한 2개의 hydroxyl 기가 생성되게 한 다음, NaIO_4 를 처리하여 aldehyde 기로 전환한다. 이를 NaCNBH_3 가 존재하에서 BSA와 반응시켰다.

나. 항체의 생산

위에서 제조한 두 종류의 pantothenic acid-BSA 결합체, 500 μg 씩을 Freund's complete adjuvant와 유탁액을 만들어 토끼 뒷 발바닥에 피하주사하였다. 이후 2주 간격으로 추가면역을 실시하였다. 단, 이때는 Freund's complete adjuvant 대신 Freund's incomplete adjuvant를 사용하여 피하주사하였다. 매 면역 1주일 후, 토끼의 귀정맥으로부터 채혈하고 항혈청을 분리하였다.

다. 항체의 역가조사

항체의 역가는 비경합 ELISA에 의해 측정하였다. 즉 microplate에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 pantothenic acid-BSA (각각 면역에 사용한 BAC법 또는 periodate법에 의해 준비한 결합체)를 coating buffer (0.02M tris buffer, 0.15M NaCl, pH9.0)로 희석하여 각 well에 100 μl 씩 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 방치하였다. 각 wells를 washing buffer로 3회 세척후, 항체를 1% BSA가 첨가된 washing buffer (10mM phosphate buffered saline, pH 7.4, 0.05% Tween 20)로 희석하여 각 well에 100 μl 씩 1시간 처리하였다. 세척후 goat anti-rabbit Ig antibody-HRP를 2차항체로서 1시간 처리후 세척하고 기질용액(0.02% H_2O_2 , TMB 0.1mg/ml in phosphate citrate buffer)을 30분

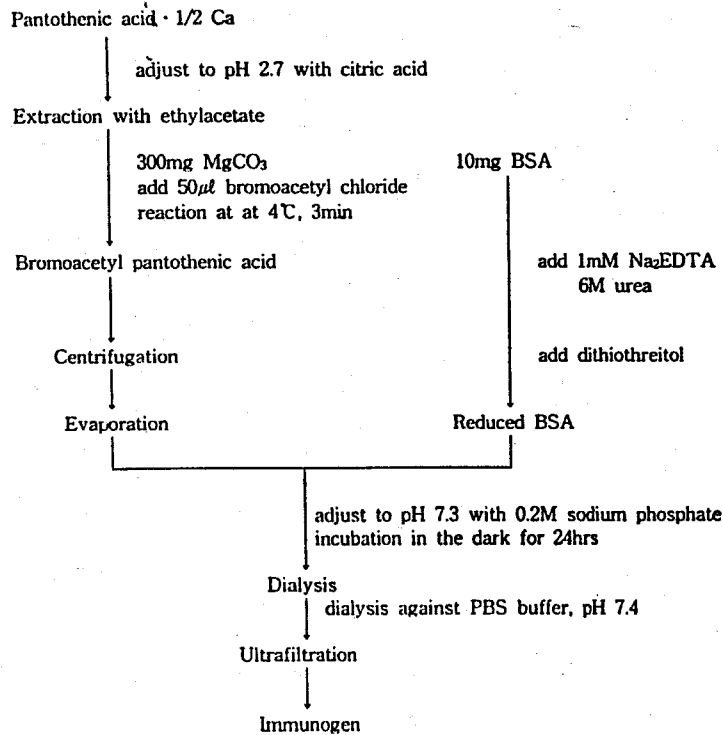


Fig. 1-5. Scheme of immunogen production using bromoacetyl chloride (BAC) method.

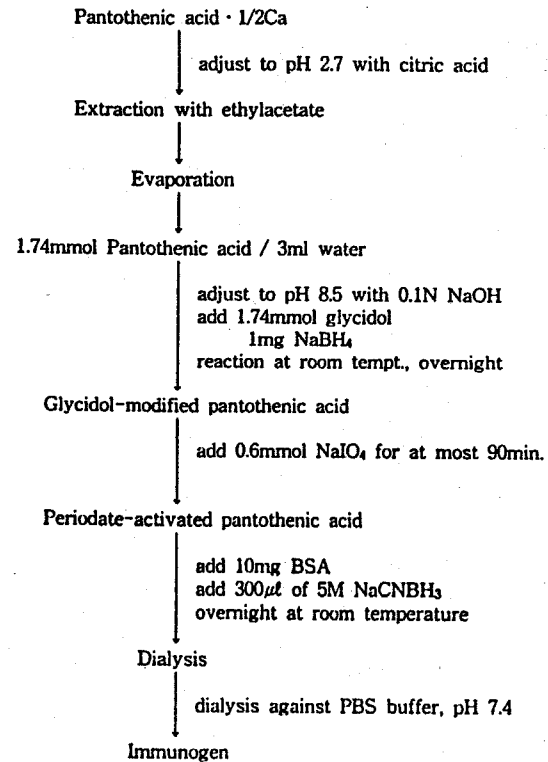


Fig. 1-6. Scheme of immunogen production using periodate-oxidation method.

반응시킨 후 2M H₂SO₄로 반응을 정지시키고, microplate reader로 450nm에서 발색의 정도를 측정하였다.

라. 간접 경합 ELISA (ciELISA)

10 μ l/ml pantothenic acid-BSA (BAC 또는 periodate) 100 μ l로 coating한 microplates에 pantothenic acid 용액과 항체 (BSA가 1% 첨가된 washing buffer로 희석한 항혈청)의 1:1혼합액을 각 wells에 100 μ l씩 처리한 다음 위의 비경합 ELISA와 같은 방법으로 실시하였다.

마. 교차반응 (Cross-reactivity)

Pantothenic acid의 유도체에 대한 교차반응을 ciELISA에 의해 측정하였다. 즉, pantothenic acid-BSA로 coating한 후 각 농도의 pantothenic acid, 또는 analogues를 위와 같이 처리한 ciELISA로 검토하였다.

바. 미생물을 이용한 분석방법

Lactobacillus plantarum (KCCM 11542, ATCC 8014)를 이용하여 AOAC법에 따라 실시하였다. Lactobacilli MRS Broth (Difco)에서 균주를 계대배양하였고 분석시는 pantothenate assay medium (Difco)으로 다음과 같이 분석하였다. 즉, *L. plantarum*을 Lactobacilli MRS agar plate에서 colony을 따서 MRS broth 10ml에 접종하여 37 °C에서 20시간 배양한 후 원심분리(3500rpm, 10min)하여 균체를 회수하고 멸균한 증류수로 3회 세척하였다. 세척한 균체는 다시 10ml의 멸균수로 희석하였다. 이를 100 μ l씩 Pantothenic acid가 함유된 10ml의 pantothenate assay medium에 접종하여 37°C, 22시간 배양하였다. 미생물의 성장도를 660nm에서의 흡광도로 측정하였다.

사. 시료에서 pantothenic acid의 추출

식품 시료로부터 pantothenic acid의 추출은 Finglas(1988)와 Walsh(1979)의 방법을 변형하여 행하였다. 식빵은 타지 않은 밝은 색의 부분을, 계란은 난백과 난황을 혼합한 것을 사용하였고 상추는 잎맥부분이

없는 곳을 골라 사용하였으며 소 간은 잘게 썬 후 사용하였다. 시료들을 각각 5g씩 0.2M tris buffer(pH 8.0) 10ml에 넣고 121°C, 15분간 멸균한 후 Omni-Mixer Homogenizer을 이용하여 30분이상 균질화하였다. 시료속의 pantothenic acid의 분리를 위해 calf intestinal alkaline phosphatase (200unit)와 pigeon liver peptidase를 첨가하여 실온에서 하룻밤 효소반응시켰다. 이후 부피를 0.2M tris buffer(pH8.0)로 100ml로 맞추고 원심분리(15,000xg, 20min)하여 상정액을 필요시 희석하여 분석에 사용하였다.

이때 pigeon liver peptidase는, pigeon liver powder (2.5%)를 50-100mesh Dowex 1-X4 anion exchange resin을 처리하여 pantothenic acid를 제거하고 원심분리후 상정액을 사용하였다.

4. 비타민 D 분석법개발 방법

가. 면역원 제조

비타민D₂와 비타민D₃는 steroid부분이 공통구조를 갖고 있으며, ergosterol은 비타민D의 전구체로 (provitamin D)로서 UV를 조사하면 비타민D로 전환되므로 (Fig. 1-3), ergosterol을 시작물질로 하여 면역원을 제작하였다.

(1) Hapten의 처리

우선, 다음과 같이 ergosterol을 처리후 22번 탄소위치를 aldehyde로 전환시켰으며 그 대체적인 scheme을 Fig. 1-7에 나타내었다.

(가) Ergosterol을 acetylation에 의하여 ergosterylacetate로 전환: Ergosterol을 pyridine 용매하에서 acetic anhydride로 상온에서 하룻밤 방치하여 반응시키고 물로 희석하여 benzene으로 추출한 다음, 1N HCl, 증류수, 포화NaHCO₃ 그리고 포화NaCl용액의 순서로 세정하고, 증발시켜 semisolid residue상태의 ergosteryl acetate를 얻었다.

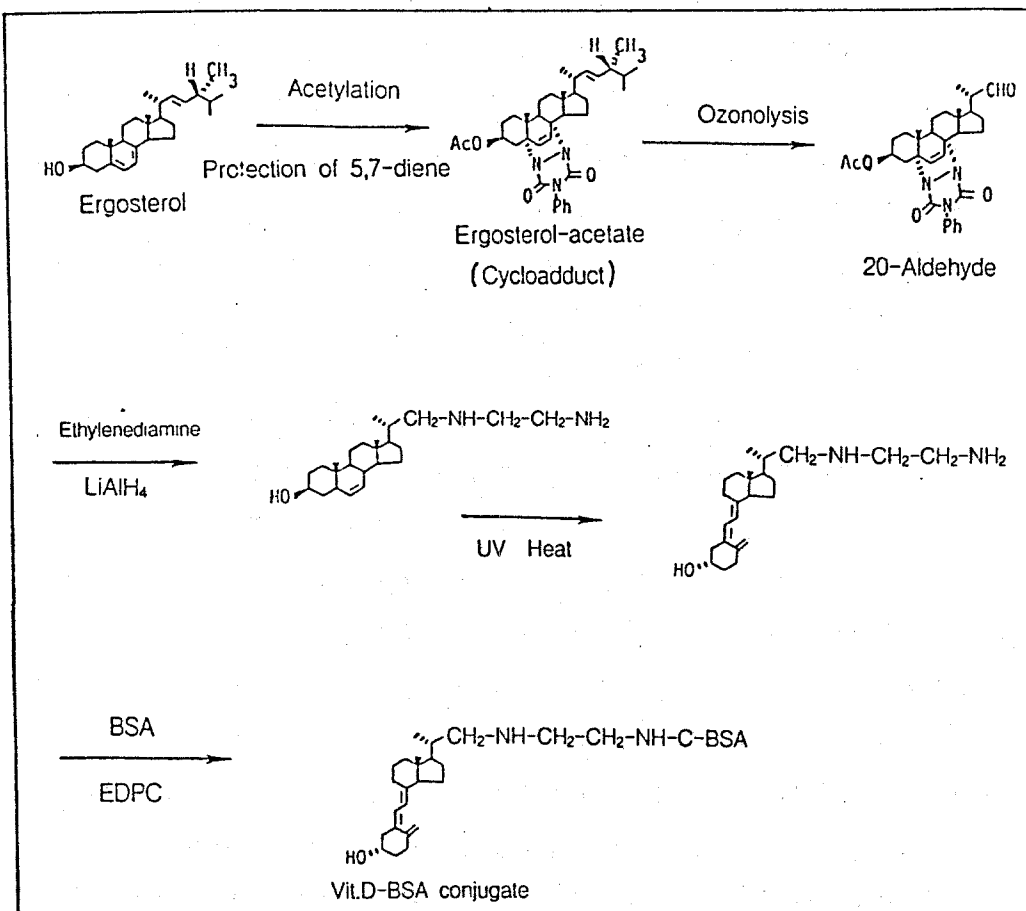


Fig. 1-7. Schematic procedure of vitamin D-BSA conjugate.

(나) Ergosteryl acetate의 5,7-diene group보호를 위하여 cycloadduct로 만들: Ergosteryl acetate를 CHCl_3 에 녹여 -70°C 의 dry acetone에 녹인 4-phenylurazole에 합하고 그 온도에서 3시간 교반하고, alumina (grade V)를 가하고 1.5시간 더 교반하였다. 여과하고 용매를 증발시키면 기름처럼 되는데 이를 benzene에 녹이고 방치함으로써 반응하지 않은 4-phenylurazole의 결정을 제거하였다. Benzene을 증발시키면 짙은 오렌지색의 기름이 되는데, ether를 가하여 잘게 부수어 고형화하였다. Ether를 증발시키고 더 많이 생성된 결정을 ethanol에서 재결정하여 무색 침상의 cycloadduct를 얻었다.

(다) Cycloadduct를 ozonolysis에 의하여 20-aldehyde로 만들: Cycloadduct를 methylene chloride와 methanol의 혼합물에 녹이고 dry ice-acetone을 이용하여 -70°C 를 유지하면서 ozonization시켰다. 이때 ozone의 유속은 약 $0.1\text{mmol}/\text{min}$ 으로 하였다. Ozonide가 생긴 용액을 질소가스로 purging하고, ozonide를 환원절단하여 aldehyde로 바꾸기 위하여 hexamethyl triaminophosphine을 가하고 -70°C 를 유지하면서 교반하였다. 다음으로 얼음으로 희석하고 ether로 추출하였다. 5% HCl과 물로 세정하고 건조한 다음 TLC로 반응하지 않은 cycloadduct로 부터 분리하였다. 반복 재결정화하여 20-aldehyde를 얻었다.

(라) 20-aldehyde에 amino기를 부착 및 활성화

20-aldehyde를 ethylenediamine (또는 ammonia)와 반응시켜 amino기를 부착시키고, LiAlH_4 를 처리하여 deblocking시킨 다음 UV조사 및 열처리로 활성화형 Vit.D의 hapten처리를 완료하였다.

(2) Conjugation

앞에서 준비한 hapren의 amino기를 carrier protein인 BSA의 carboxyl기에 결합시키기 위하여 WSC (water soluble carbodiimide) 방법을 사용하였다. 즉, EDPC존재하에 이들을 반응함으로써 활성화형

Vit. D-BSA conjugate를 준비하였다. 탈염후 면역원으로 사용하였다.

나. 항체의 생산

면역원 500 μ g을 Freund's complete adjuvant (FCA)와 동량비로 혼합하고 유탁액을 만들어 토끼 뒷발바닥에 마리당 1ml씩 피하주사하였다. 2주일 후 FCA대신 Freund's incomplete adjuvant (FIA)를 사용하여 추가 면역을 실시하였다. 면역 1주일 후, 토끼의 귀정맥으로부터 채혈하여 항혈청을 분리하였다. 항체의 역가는 비경합 ELISA에 의해 측정하였다. 즉 microplate의 well당 2 μ g/ml의 Vit. D-BSA를 100 μ l씩 coating한 후, 희석한 항혈청을 처리하고 goat anti-rabbit IgG-HRP를 반응시킨 후, 기질용액 (TMB)을 첨가하여 효소반응시킨 다음, 450nm에서 발색의 정도를 측정하였다.

다. 간접경합 ELISA

면역원인 Vit. D-BSA를 코팅한 후 free vitamin D와 항체 용액을 BSA 0.5%의 존재하에서 1:1로 혼합하여 경합반응을 시킨 2차항체를 처리하였다. 이후 TMB 기질용액을 처리하고 흡광도를 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Biotin의 검출법 개발

가. 효소면역측정법 (ELISA)

(1) Biotin-KLH conjugate의 특성

ELISA를 이용하여 biotin을 분석하기 위해서는 특이성과 결합력이 뛰어난 항체가 필요하다. 그러나 biotin은 분자량이 224.3 dalton으로 매우

내용누락

(anti-biotin-antibody)이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 대체로 첫 면역 후 일주일만에 biotin에 대한 특이항체를 생성했으며 4차 면역 후에는 매우 높은 항체 역가의 항체를 생산하기 시작했다. KLH 하나당 biotin 1.8 개가 부착된 biotin-KLH를 면역원으로 사용했음에도 불구하고, 이와 같이 높은 항체가 유도할 수 있었던 것은, 항원 용액을 면역 증강제인 Freund's adjuvant와 함께 유탁액을 만들어서 면역하고, 면역 부위를 등 및 발바닥으로 바꿔 가면서 여러 차례 추가 면역 (boost)하였기 때문인 것으로 생각된다. 항체가가 높았던 4 차와 5 차 항혈청을 사용하여 cdELISA에 의해 biotin에 대한 결합의 정도를 조사하였다. 동일한 조건에서 분석하였을 때, Fig. 1-9에 나타난 바와 같이 3 번 토끼의 5 차 항체가 가장 결합이 잘 일어났으며 발색치도 가장 높게 나타났다. 따라서 이후의 실험에서는 3 번 토끼의 5 차 항혈청을 사용하였다.

분석시에 항혈청을 그대로 사용하면, 항체 이외에 혼입되어 있는 혈청 성분이 분석시 방해 요인이 될 수도 있으므로 시료 분석시에는 항체를 정제하여 사용하였다. 즉, cdELISA로 시료중의 biotin을 측정할 때 분석 효율을 높이기 위하여 microplate에 coating할 항혈청을 protein A column으로 정제하고 sephadex G-25 column으로 탈염 (desalting)하여 사용하였으며, 전자의 chromatogram은 Fig. 1-10에 나타난 바와 같다. 이 분획들을 전기영동 (SDS-PAGE)하여 확인하였다. 즉, desalting column을 통과시켜 얻은 주요 분획들 (3, 4, 5 분획)의 항체가 heavy chain (50 kDa)과 light chain (25 kDa)으로 해리된 band 만을 나타냈으므로 정제된 항체는, 순도가 높은 항체 (IgG)를 함유하고 있는 것으로 판단되었다.

(3) 결합적 ELISA의 분석 조건 검토

Biotin의 분석에 결합적 ELISA를 사용하기 위하여 기본적인 분석 조건을 검토 하였다.

직접법에 의한 결합 ELISA (cdELISA)의 경우에 coating 항체의 희석

내용누락

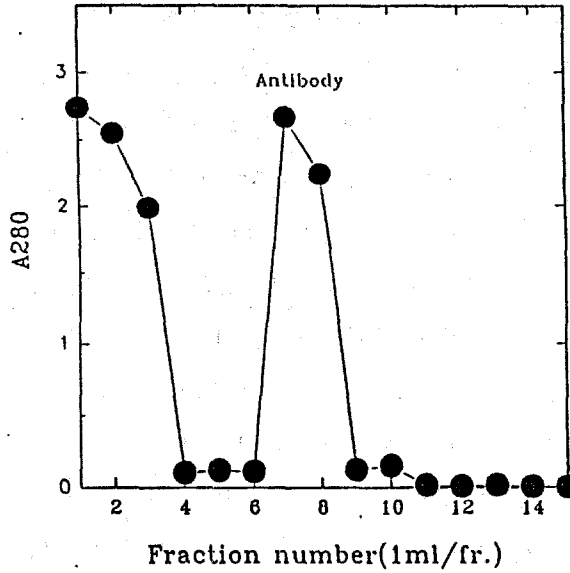


Fig. 1-10. Chromatogram of rabbit antibody (IgG) on protein A column.

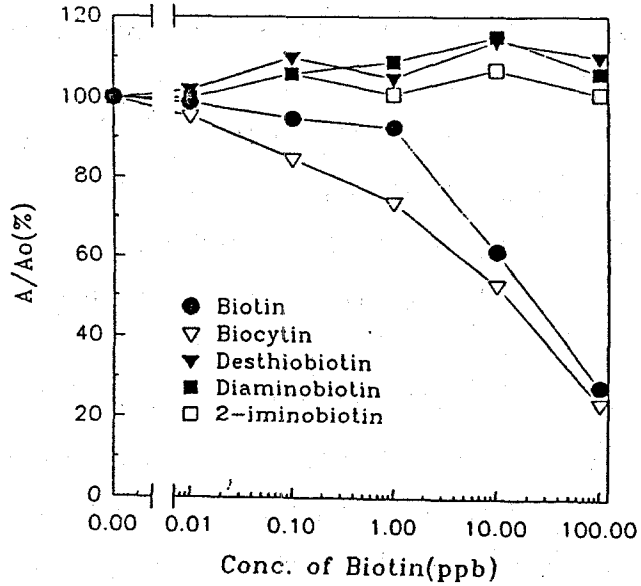


Fig. 1-11. Reactivity of polyclonal antibody toward biotin derivatives as determined by cdELISA.

농도, blocking 유무, biotin-효소 접합체인 biotin-HRP의 희석 농도, 기질의 종류 등을 검토하였다. 단백질 농도가 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 coating buffer에 희석한 항체를 100 μl 씩 well에 채우고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하루밤 방치시킨 후 cdELISA를 행하였다. Biotin-HRP의 농도는 40 ng/ml (ppb)을 최적 농도로 하여 사용하였다. 이는 biotin의 경합 반응시에 너무 많은 항체가 존재하게 되면, 시료중의 biotin의 농도차이에 따른 흡광도의 변화가 민감하게 나타나지 않기 때문에 이러한 현상을 피하기 위함이었다. 또한 발색을 위해 첨가하는 기질로서 ABTS/ H_2O_2 와 TMB/ H_2O_2 를 사용하여 비교하였을 때, 후자의 경우가 HRP에 대하여 매우 민감하게 발색되었으므로, 본 연구에서는 0.01 %의 TMB (0.01 % TMB, 0.05 M phosphate citrate buffer, pH 5.0, 0.1 % hydrogen peroxide)를 발색기질로 사용하였다.

간접법에 의한 ELISA의 경우에도 microplate well에 coating시키는 항원으로서 biotin-KLH conjugate의 농도, coating 방법, coating 후의 blocking 방법, 1 차 항체인 항 biotin 항체의 희석배율 및 희석시 사용하는 buffer, 2 차 항체-효소 접합체의 희석 배율, 기질의 종류 등을 각각 검토하였다. 항원으로 사용되는 biotin-KLH는 coating buffer로 희석하여 단백질 농도를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 농도로 조정한 후, 100 μl 씩 well에 채우고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하루밤 반응시키는 방법을 이용하였다. 또한 항원과 반응하는 1 차 항체의 농도는 흡광도의 변화율이 가장 높게 나타난 40 ng/ml (ppb)를 최적 농도로 하여 사용하였으며, 1 차 항체와 결합하는 2 차 항체-효소 접합체인 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate는 1/2,000을 희석배율로 하였다. 또한 발색을 위해 첨가하는 기질로 ABTS/ H_2O_2 와 TMB/ H_2O_2 를 사용하여 비교하였으나 간접법에 의한 ELISA 분석에서 biotin의 경합 반응이 제대로 이루어지지 않았다. 이는 항 KLH 항체의 영향으로 생각되었으므로 이를 배제하기 위하여 biotin-BSA를 항원으로 coating하여 ciELISA를 하였으나 검출 감도가 낮아서 실제로 이용하기에는 적절하지 않았다.

Biotin 항체를 이용한 경합적 ELISA의 직접법과 간접법에 의하여

biotin을 분석할 때, 두 방법 모두 항체나 항원을 coating한 후에 blocking을 하지 않았다. 이는 본 실험에서 항체와 항원이 경합적으로 결합하는 반응단계에서, washing buffer 중에 존재하는 0.05 % Tween 20이 well 표면 등에서 비특이적인 결합을 저해시켜 분석에 영향을 주지 않았기 때문인 것으로 생각된다. 통상적으로 blocking에 사용되고 있는 0.5 % gelatin을 사용하여 blocking을 하고 blocking을 하지 않았을 때와 분석치를 비교하여 보았을 때, 분석에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 또한 항원과의 경합적 결합을 위하여 well에 첨가하는 biotin-HRP와 biotin, 또는 항체와 biotin의 동량 혼합액을 사전에 충분히 혼합하였을 때 안정된 분석치를 얻을 수 있었다.

이상에서와 같이 직접법에 의한 분석은 간접법보다 검출감도가 높고, 2 차 항체 처리 시간이 절약되므로 간편하고 신속하여 많은 양의 시료를 동시에 분석할 수 있어 실용화에 적합한 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 직접법에 의한 경합적 ELISA에 의하여 biotin을 분석하였다.

(4) 항biotin 항체의 교차반응

항 biotin 항체는 biotin과 구조가 비슷한 유사 비타민과도 결합이 가능하므로, 이를 직접법에 의하여 검토했다. 즉 cdELISA에 의해, biotin의 유도체들에 대한 특이항체의 교차반응 (cross reactivity)을 검토했다. 그 결과 Fig. 1-11에서와 같이 biotin보다는 biocytin이 특이항체에 더 잘 결합하는 것으로 나타났다. 각 유도체들의 교차반응의 정도는, biotin에 대한 결합정도를 100 %로 하였을 때, biocytin이 177 %였으며 desthiobiotin, diaminobiotin, 2-iminobiotin은 모두 0 %로 나타났다 (Table 1-1). 이상에서 알 수 있듯이, 본 실험에서 사용한 항 biotin 항체는, biotin보다는 biocytin과 더 잘 결합하였다. 그러나 biocytin은 생체내에서 biotin으로 전환되기 때문에, 결국 biotin의 총량을 정량할 수 있게 되는 것이므로 교차반응으로 인한 문제는 없는 것으로 생각된다. 또

Table 1-1. Cross-reactivity of biotin and its derivatives with polyclonal antibody as determined by cdELISA

Biotin derivative	IC ₅₀ (ppb)	Cross-reactivity (%)
Biotin	22.3	100
Biocytin	12.6	177
Desthiobiotin	—	0
Diaminobiotin	—	0
2-Iminobiotin	—	0

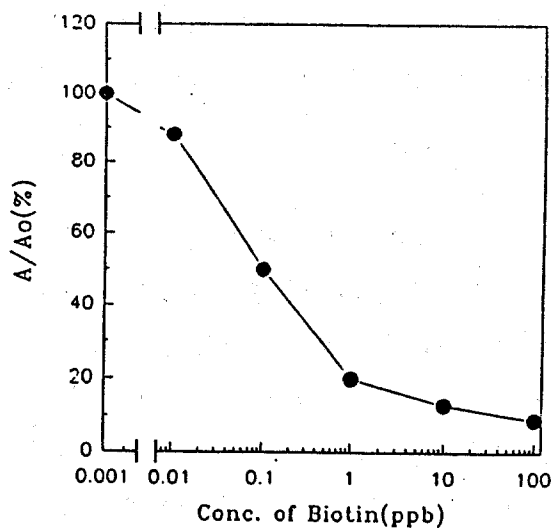


Fig. 1-12. Standard curve of cdELISA for biotin.

한 동물체내에서 biotin으로 전환되지 않는 다른 유도체들에 대해서는 전혀 교차반응을 하지 않는 것으로 보아 이 항체는 biotin의 총량을 측정할 수 있는 매우 특이적인 항체임을 알 수 있었다.

(5) 직접법에 의한 표준곡선의 작성

Biotin 표준곡선은 시료를 분석할 때마다 동시에 작성하였다. Biotin 표준용액의 농도를 0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 10, 30, 100, 300, 1000 ppb가 되게 washing buffer로 각각 희석하고 biotin-HRP와 함께 cdELISA로 분석하여 Fig. 1-12와 같은 표준곡선을 구하였다. 측정 가능한 biotin의 농도 범위는 0.01-300 ng/ml로 비교적 넓은 범위에 걸쳐 분석이 가능하였고 검출 감도도 매우 높아서 biotin의 검출 한계가 0.01 ng/ml (ppb)로 나타났다. 이 결과는 Lee 등 (Lee *et al.*, 1990)에 의한 ELISA의 경우보다 약 400 배 이상 높은 것으로서 매우 양호한 검출 감도였다. Conjugation의 방법과 사용 단백질의 종류 그리고 사용기질 등의 분석조건에 의하여 얻어진 결과로 보이며 BSA보다는 KLH를 biotin에 대한 carrier protein으로 사용하는 것이 훨씬 효과적이었음을 알 수 있었다. 또한 검출 가능한 농도의 범위가 넓기 때문에 biotin의 함량이 다양하게 분포되어 있는 여러 가지 식품의 분석에 실용화할 수 있는 분석방법으로 생각된다.

나. 효소-단백 결합분석법 (EPBA)

cdELISA의 기본 원리를 활용하여 biotin을 분석하는 EPBA는 항체 대신에 biotin 결합 단백질을 사용하므로 항체를 생산할 필요가 없어 매우 간편한 방법이라 할 수 있다. Avidin 유도체인 streptavidin과 ELISA에서의 항체 생산을 위해 제작한 biotin-KLH와 biotin-LC-BSA를 이용하여 EPBA 분석을 하였다.

Streptavidin에 유리 biotin과 biotin-HRP conjugate를 경합시킨

EPBA에서는 Fig. 1-13에 나타난 바와 같이 streptavidin에 대하여 biotin보다 biocytin이 더 잘 결합하였다. 교차 반응의 정도는 Table 1-2에서와 같이 biotin 100 %에 대하여 biocytin이 109 %로 비교적 낮은 교차 반응을 보였고 다른 유도체들은 모두 0 %의 교차반응율을 보였다. 이 결과는 Bitsch 등과 Finglas 등 (Bitsch and Hötzel, 1989 ; Finglas *et al.*, 1986)에 의한 EPBA의 결과와 달리 desthiobiotin에 대한 교차반응은 일어나지 않았으며 검출감도도 0.01 ng/ml로서 이들의 연구 결과에서 보다 약 5 배 정도 높았다. 검출 가능한 biotin의 농도는 표준곡선으로 부터 0.01-30 ng/ml로 확인 되었다. 따라서 ELISA (0.01-300 ng/ml)에 의한 biotin 검출범위보다는 비교적 좁은 검출 범위였다. 따라서 avidin 보다는 avidin 유도체인 streptavidin을 이용한 EPBA에서 비특이적인 결합이 제거 되므로써 biotin 분석에 훨씬 효과적이었음을 확인하였다 (Bayer and Wilchek, 1992).

면역원으로 사용했던 Biotin-KLH conjugate와 streptavidin- HRP conjugate를 이용한 EPBA에서도 Fig. 1-14에 나타난 바와 같이 biotin보다 biocytin에 결합하는 비율이 높았으며 다른 유도체에 대해서는 교차반응이 일어나지 않았다. 각 교차반응율은 Table 1-3과 같이 biotin 100 %에 대하여 biocytin이 197 % 였으며 나머지 유도체들은 0 %의 교차반응을 보였다. 또한 표준곡선에 의한 검출한계는 0.01 ppb였고, 검출범위도 0.01-1.0 ng/ml로 나타나, Finglas 등 (1986)의 결과보다 훨씬 좋은 검출감도를 보였다. 이는 biotin과 KLH의 접합 방법에서의 차이와 avidin보다 반응성이 좋은 streptavidin-HRP conjugate를 효소 기질로 사용하였기 때문인 것으로 생각된다.

Biotin-LC-BSA와 streptavidin-HRP conjugate를 사용한 EPBA의 교차 반응은 다른 EPBA의 경우와 마찬가지로 biotin 보다는 biocytin에 더 잘 결합하였다 (Fig. 1-15). Table 1-4에 나타난 바와 같이 교차반응율은 biotin 100 %에 대하여 biocytin 이 300 %로 나타났으며 다른 유도체들의

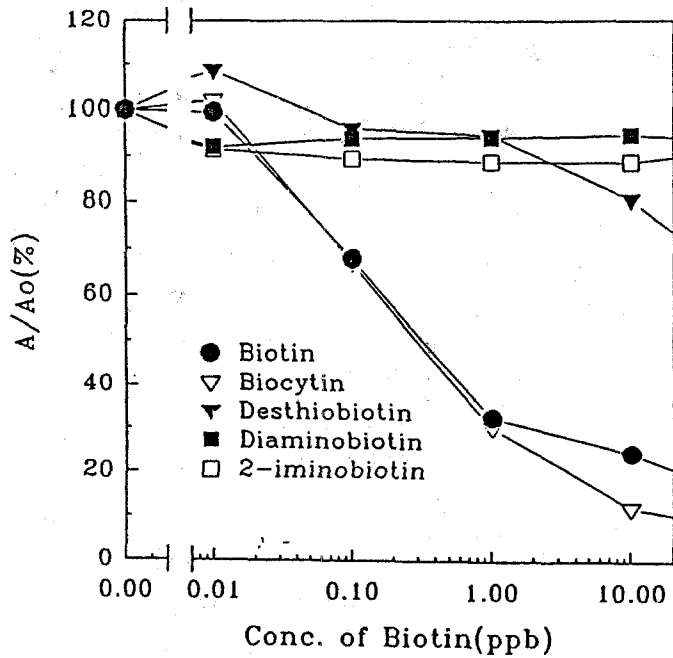


Fig. 1-13. Reactivity of streptavidin toward biotin derivatives as determined by streptavidin coated EPBA.

Table 1-2. Cross-reactivity of biotin and its derivatives with streptavidin as determined by streptavidin coated EPBA

Biotin derivative	IC ₅₀ (ppb)	Cross-reactivity (%)
Biotin	0.33	100
Biocytin	0.30	109
Desthiobiotin	—	0
Diaminobiotin	—	0
2-Iminobiotin	—	0

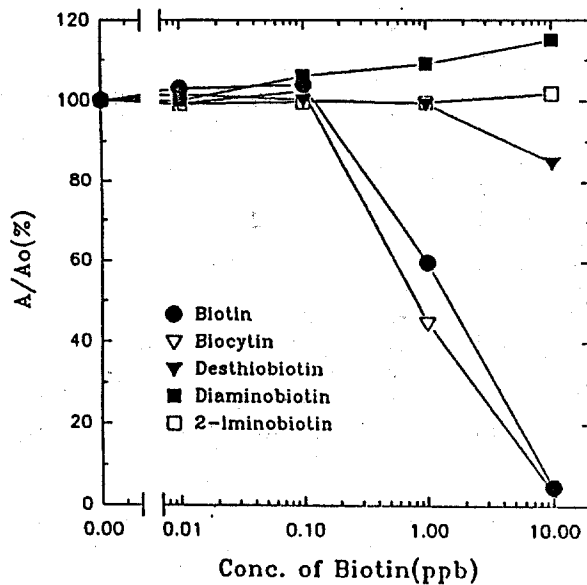


Fig. 1-14. Reactivity of streptavidin-IIRP toward biotin derivatives as determined by biotin-KLH coated EPBA.

Table 1-3. Cross-reactivity of biotin and its derivatives with streptavidin-IIRP as determined by biotin-KLH coated EPBA

Biotin derivative	IC ₅₀ (ppb)	Cross-reactivity (%)
Biotin	1.58	100
Biocytin	0.80	197
Desthiobiotin	—	0
Diaminobiotin	—	0
2-Iminobiotin	—	0

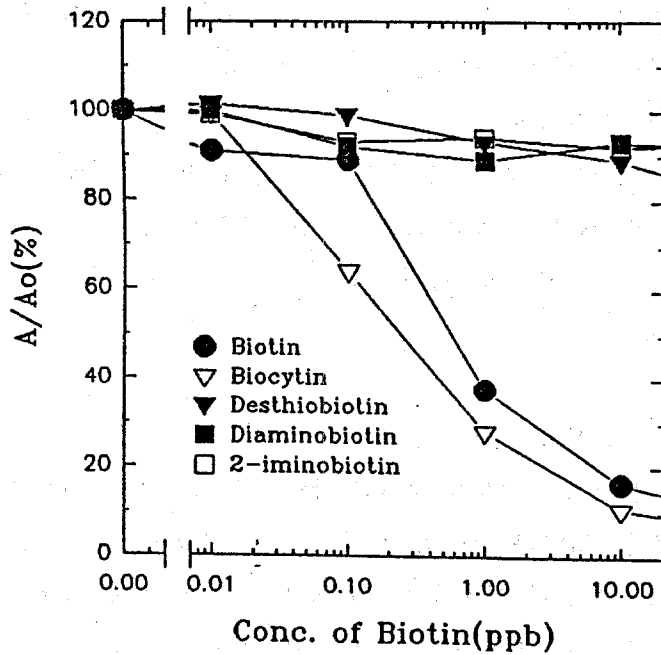


Fig. 1-15. Reactivity of streptavidin-HRP toward biotin derivatives as determined by biotin-LC-BSA coated EPBA.

Table 1-4. Cross-reactivity of biotin and its derivatives with streptavidin-HRP as determined by biotin-LC-BSA coated EPBA

Biotin derivative	IC ₅₀ (ppb)	Cross-reactivity (%)
Biotin	0.60	100
Biocytin	0.20	300
Desthiobiotin	—	0
Diaminobiotin	—	0
2-Iminobiotin	—	0

교차반응율은 0 %였다. 또한 표준곡선에 나타난 검출 한계가 0.01 ppb로서 검출 감도는 높았으나 검출범위가 매우 좁았으므로 실제로 식품의 분석에 적용하기는 쉽지 않을 것으로 생각된다.

이상의 결과에 따라서 biotin의 분석을 위해서는 streptavidin을 이용한 EPBA가 검출감도도 높고 교차반응율이 적었으며, 또한 검출범위도 비교적 넓어서 여러 가지 식품종의 biotin 분석에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

다. 미생물 분석법 (MBA)

현재까지 biotin 분석에 공인된 방법으로 사용되어 왔던 MBA와 본 연구에서 확립한 ELISA와 EPBA의 분석방법을 비교하였다. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014를 이용하여 biotin 유도체들에 대한 교차반응을 보였으며 그 결과는 Fig. 1-16에 나타난 바와 같다. MBA에 의한 분석에서는 biotin 과 biocytin, desthiobiotin에 대하여 모두 교차반응이 일어났으며 각각의 교차반응율은 Table 1-5와 같았다. Biotin 100 %에 대하여 biocytin이 81 %의 교차반응율을 보였으며, Miller 등 (Miller, 1982)에 의한 실험 결과에서와 마찬가지로 desthiobiotin에 대하여서도 67 %의 교차반응이 일어났다. 즉, 미생물 분석법에 의한 biotin의 측정시, 동물체 내에서는 biotin의 효율을 갖지 않는 desthiobiotin과도 교차반응이 일어났으며, 또한 Fig. 1-17의 표준곡선에서 알 수 있듯이 검출한계가 ELISA나 EPBA에 의한 경우보다 10 배 낮은 0.1 ppb로 나타났다.

Biotin의 분석에 사용되는 각 방법들에 대하여 분석에 소요되는 시간, 검출 한계, 교차반응율 등의 여러 가지 면에서 비교하여 볼 때, Table 1-6에서와 같이 특이항체를 이용한 cdELISA나 streptavidin을 이용한 EPBA로 biotin을 분석하는 것이 MBA에 비하여 특이성이 높고 재현성이 있으며 간편한 분석방법인 것으로 나타났다. 특히 streptavidin을 이용한 EPBA는 항체를 생산할 필요가 없어서 ELISA보다 분석에 소요되는 시간이 적어 때

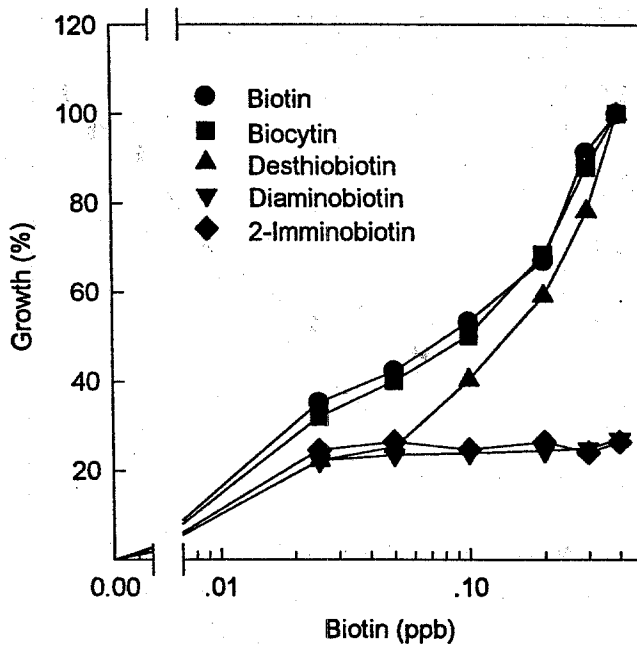


Fig. 1-16. Determination of biotin and its derivatives by microbiological assay (MBA) using *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.

Table 1-5. Cross-reactivities of biotin and its derivatives by MBA with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

Biotin derivatives	IC ₅₀ (ppb)	Cross reactivity* (%)
Biotin	0.08	100
Biocytin	0.10	81
Desthiobiotin	0.12	67
Diaminobiotin	-	0
2-Imminobiotin	-	0

* $\frac{\text{Conc. of biotin inhibiting 50 \% of } L. \textit{ plantarum} \text{ growth}}{\text{Conc. of derivatives inhibiting 50 \% } L. \textit{ plantarum} \text{ growth}} \times 100$

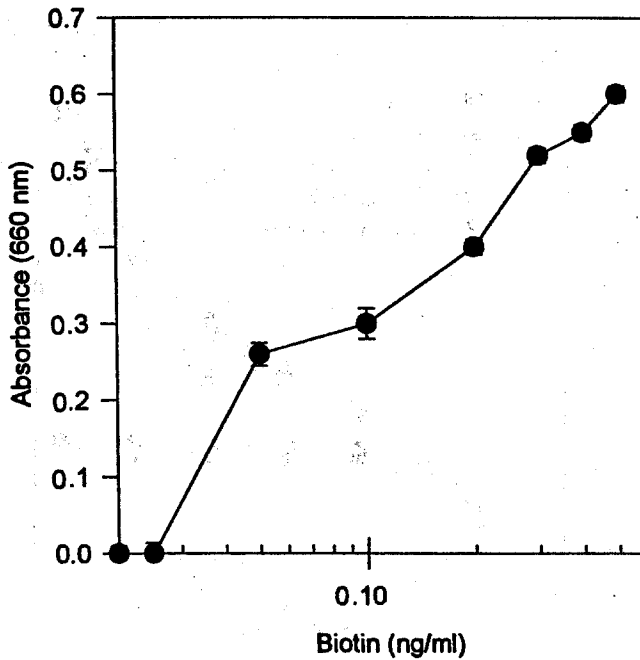


Fig. 1-17. Standard curve for biotin determination by MBA with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.

Table 1-6. Comparisons of MBA, ELISA and EPBA for biotin determination in foods

Methods	MBA	ELISA	EPBA			
			Streptavidin	Bio-KLH	Bio-LC-BSA	
Reagents	Test cultures, media, etc.	Anti sera, plates	Biotin binding protein			
Detection limit (ppb)	0.1	0.01	0.01			
Time (hr.)	48	1.5	1.5			
Cross reactivity (%)	Biotin	100	100	100	100	
	Biocytin	80.1	177	109	197	300
	Desthiobiotin	66.7	109	0	0	0
Detection range (ppb)	0.1-0.5	0.01-300	0.01-30	0.01-1.0	0.01-1.0	

우 간편한 방법으로 나타났다. 그러나 이 경우에는 검출농도의 범위가 0.01-30 ppb로 비교적 좁기 때문에 biotin의 함량이 어느정도 일정하게 제한되어 있는 시료들의 biotin 분석에서 유용할 것으로 생각된다. 또한 biotin의 함량이 다양하게 분포되어 있는 식품시료에서는 ELISA에 의한 분석법이 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

라. 검출법의 분석 효율성 검토

(1) 추출 조건의 검토

이상에서 확립된 검출방법을 활용하여 실제로 여러 가지 식품의 biotin 함량을 분석하였다. 분석에 사용한 시료들은 단백질 식품, 탄수화물 식품, 주스류 등으로 구분하여 실험 방법에 명기한 방법에 따라 각각 전처리하고, 검출범위 내의 농도가 되도록 washing buffer로 단계별로 희석하여 사용하였다. 각 식품마다 biotin 함량에 대한 정확한 식품 성분표가 없고 가공식품에도 영양표시 (nutrition fact)가 되어 있지 않았으므로 MBA를 기준으로 하여 ELISA 및 EPBA를 이용하여 분석하였다. 회수율과 수분 함량을 고려하지 않은 시료의 중량 (g 또는 ml)에 대한 biotin의 평균 함량 (ng)과 분석치의 범위는 Table 1-7에 나타난 바와 같다.

우유의 경우에 MBA에 의한 biotin 함량은 평균 32.20 (28.5-35.0) ng/ml이었고 ELISA에서는 35.90(34.2-37.6) ng/ml, EPBA에서는 32.10(30.5-34.5) ng/ml의 분석치를 나타내어 ELISANA EPBA에 의한 분석치와 MBA에 의한 분석치 간의 상관관계가 매우 컸으나, MBA에서는 분석치의 범위가 28.5-35.0 ng/ml로 분석치간의 오차가 비교적 크게 나타났다. 탄수화물 식품인 과일 플레이크에서는 각각 9.35(7.0-11.0), 16.5(14.5-18.0), 12.2(9.5-14.0) ng/g으로 분석되었으며, 당근-파인애플 주스의 경우는 8.6(6.2-11.2), 15.2(9.5-14.5), 11.0(8.2-11.0) ng/ml로 나타나 각 방법들 간의 분석치가 부분적으로 심하게 차이가 있었다. 이는 시료마다 추출방법을 각각 다르게 사용하였기 때문에 각 시료들의 전처리

Table 1-7. Comparisons of MBA, ELISA and EPBA for biotin determination in foods

Foods	MBA	ELISA	EPBA (streptavidin)
Milk	32.2 ^a (28.5-35.0) ^b	35.9 (34.2-37.6)	32.1 (30.5-34.5)
Flake	9.3 (7.0-11.0)	16.5 (14.5-18.0)	12.2 (9.5-14.0)
Juice	8.6 (6.2-11.2)	15.2 (9.5-14.5)	11.0 (8.2-11.0)

^a Mean of biotin concentration (ng/ml, ng/g)

^b Range of biotin concentration detected

Table 1-8. Recoveries of biotin from foods

Foods	Biotin added ^a (ng/g, ml)	Biotin detected (ng/g, ml) ^b			Recovery rates of biotin (%)		
		MBA	ELISA	EPBA	MBA	ELISA	EPBA
Milk	0	32.2	35.9	32.1	100.0	100.0	100.0
	20	48.3	57.3	47.5	92.6	102.5	91.2
	200	226.7	219.5	213.5	97.3	93.0	91.8
	2,000	2,806.1	2,612.3	2,171.0	138.1	128.3	106.8
					Ave.=109.3	Ave.=107.6	Ave.=96.6
Flake	0	9.4	16.5	11.0	100.0	100.0	100.0
	20	18.6	28.5	23.2	63.2	78.0	74.8
	200	164.3	163.7	152.6	78.5	75.4	72.0
					Ave.=70.8	Ave.=76.7	Ave.=73.4
Juice	0	8.6	15.2	12.2	100.0	100.0	100.0
	20	19.7	25.3	19.8	68.9	71.8	61.5
	200	128.0	151.4	63.2	61.4	70.3	76.8
					Ave.=65.1	Ave.=71.1	Ave.=69.2

^a Biotin added to sample prior to extraction

^b Mean of biotin detected

방법에 따른 여러가지 요인에 의한 결과로 판단되었다. 그러므로 각 시료마다 다르게 설정된 추출 조건의 효율성을 검토하기 위하여 biotin의 회수율을 측정하였다.

(2) 인위적으로 첨가시킨 biotin의 회수율 분석

우유 및 과일 플레이크, 당근-파인애플 주스에 대하여 대하여 추출 전에 인위적으로 첨가시킨 biotin의 함량과 추출 후에 회수된 biotin의 함량을 측정하여 각각의 회수율을 구하였다. 각 시료마다 g (또는 ml)당 20 ng, 200 ng, 2000 ng의 biotin을 첨가하였으며, 0 ng/g의 첨가치는 그 식품에 존재하는 고유 biotin함량으로 하여 계산하여 Table 1-6의 분석치를 이용하였다. 추출조건이 다른 각 시료에 대하여 MBA과 ELISA, EPBA의 분석방법을 사용하여 biotin의 회수율을 측정하였으며 그 결과는 Table 1-8에 나타난 바와 같다. 단백질 식품류인 우유시료인 경우에 각각 109.3 %, 107.6 %, 96.6 %의 높은 회수율을 보였으나, 탄수화물 식품류인 과일 플레이크의 경우에는 70.8 %, 76.7 %, 73.4 %, 그리고 당근-파인애플 주스는 65.1 %, 71.1 %, 69.2 %의 낮은 회수율을 각각 나타냈다. 주스에서의 biotin 회수율이 낮은 것은 아마도 주스중에 존재하는 색소나 비타민 C가 biotin의 분석을 방해하기 때문인 것으로 판단된다. 그러므로 주스 시료를 추출하는 과정 중에 ascorbate oxidase를 처리하는 단계를 첨가하는 등, 분석시 장애요인을 제거하는 과정 (Hood, 1980)이 필요한 것으로 나타났다.

또한 우유시료의 biotin 회수율이 다른 시료들의 회수율에 비하여 현저하게 높은 것은, biotin이 식품중에서 단백질과 결합된 상태로 존재하기 때문에 이를 분리시키기 위하여 행했던 여러 가지 방법들이 유리 biotin의 양을 증가시켰기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 biotin의 분석에 있어서, 단백질 분해 효소인 papain 첨가와 산 또는 알칼리 가수분해 등에 의한 추출방법이 가장 적절한 방법인 것으로 나타났으며 이는 Hood의 결과

및 Hoppner 등의 결과와 일치하였다 (Hood, 1977 ; Hoppner and Lampi, 1983, 1987, 1989, 1990, 1992, 1994 ; Lee *et al.*, 1990).

그러므로 biotin의 분석에 있어서 ELISA 및 EPBA를 활용하여 분석을 신속하고 간편하게 하기 위해서는 시료의 전처리 과정을 간단하게 할 수 있는 추출 조건을 각 식품의 특성에 맞게 설정하여 최적화하는 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

(3) 검출법의 신뢰성 검증

시료의 분석 (Table 1-6)과 회수율 분석에서의 분석치들 (Table 1-7)을 이용하여 cdELISA와 EPBA (streptavidin)의 방법과 기존의 분석법인 MBA 간의 상관관계를 구하였다. MBA와 ELISA 그리고 MBA와 EPBA의 분석치는 Fig. 1-18과 Fig. 1-19에 나타난 바와 같이, 두 경우 모두 매우 높은 상관계수 (correlation coefficient)를 나타내었다. ELISA의 경우에 $r=0.992$ 의 높은 상관도를 보였으며, streptavidin에 의한 EPBA의 경우에는 $r=0.979$ 로 비교적 높은 상관관계를 갖는 것으로 나타났다.

그러므로 본 실험에서 개발한 ELISA나 EPBA에 의한 생물 특이적 기법 (biospecific method)을 이용하여 biotin을 분석하는 경우 신속하고 정확하며 간편하게 다량의 시료를 분석할 수 있어 식품이나 사료 등의 biotin을 측정하는 방법으로 활용할 수 있을 것으로 생각되며, 나아가 분석의 한계성을 극복할 수 없었던 생화학 및 임상 연구분야 등에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다 (Table 1-9).

2. Pantothenic acid의 검출법 개발

가. 효소면역측정법 (ELISA)

(1) 항체의 생산 및 특성

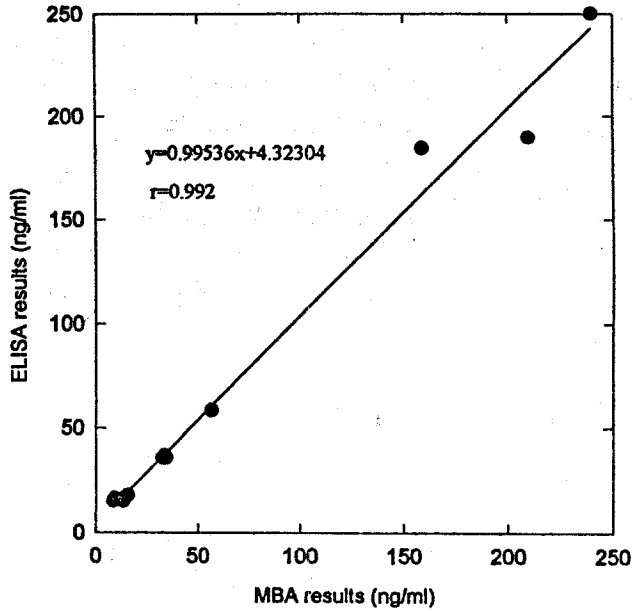


Fig. 1-18. Correlation of biotin contents assayed by MBA and those by cdELISA (n=12).

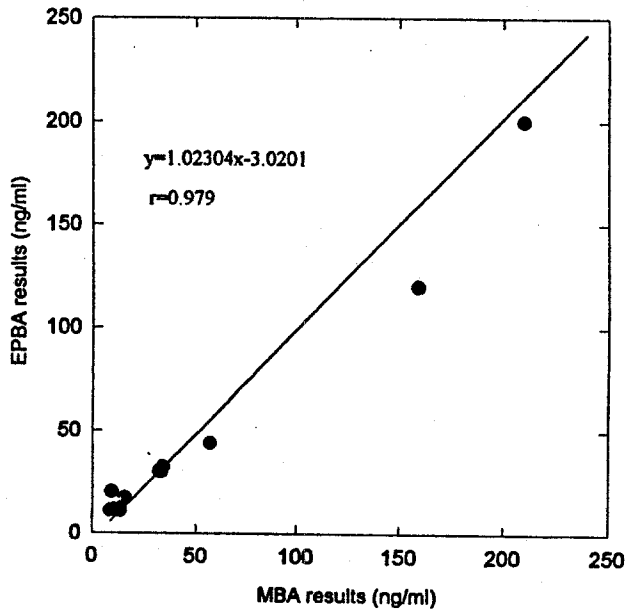


Fig. 1-19. Correlation of biotin contents assayed by MBA and those by streptavidin coated EPBA (n=12).

Table 1-9. Summary of biospecific methods for biotin assay in foods

	ELISA	EPBA coated with			MBA
		Biotin-KLH	Biotin-BSA	Streptavidin	
Detection limit (ng/g)	0.02	0.3	0.2	0.03	0.05
Cross-reactivity against biocytin (%)	177	197	300	109	66*
Assay length (hr)	1.5	1.5	1.5	1.5	48
Correlation with MBA (a / r value)	0.995 / 0.982	0.857 / 0.979	0.691 / 0.994	1.023 / 0.976	—

*MBA has additional responses to biotin D-sulphoxide(100%) and D,L-oxybiotin(50%), to which biospecific methods do not have responses (Bonjour, 1991).

비경합 ELISA에 의해 두 종류의 면역원 (pantothenic acid-BSA(BAC) 또는 pantothenic acid-BSA(periodate))에 대한 항체의 역가를 조사한 결과, Fig. 1-20에 나타난 바와 같이 2차면역 이후 두 경우 모두 양호한 항체가 생성되었음을 알 수 있었다. 이후의 실험에서는 3차 항혈청을 사용하였다.

(2) ciELISA

두 종류의 면역원을 coating항원으로 하고 이들에 대한 두 종류의 항체를 각각 이용하여 2x2, 도합 네 경우의 ciELISA를 예비적으로 실시하고 어느 조합에서 양호한 경합이 일어나는지를 검토하였다. 그 결과 Fig. 1-21과 Fig. 1-22에 나타난 바와 같이 pantothenic acid-BSA(periodate)를 coating하고 항체로서 항pantothenic acid-BSA(BAC)항체를 사용한 경우에만 양호한 경합반응을 보였다.

(3) 표준곡선

완충액에 용해한 pantothenic acid를 이용하여 실시한 ELISA의 표준곡선은 Fig. 1-23과 같다. 여기에서 pantothenic acid의 검출한계는 1ug/ml (ppm)임을 알 수 있었으며, 이는 기존의 보고에 비하여 10배이상의 낮은 검출감도로서 개선의 필요가 있다.

(4) 교차반응 (cross-reactivity)

대표적인 pantothenic acid 유도체들에 대한 교차반응을 ciELISA로 검토하였을 때, Fig. 1-24에 나타난 바와 같이 항pantothenic acid-BSA(periodate) 항체는 pantoyllactine, pantethine, pantothenyl alcohol, Acetyl CoA 등과는 거의 반응성이 없어 특이성이 매우 강하였다. 이는 Morris 등(1988)의 경우 CoA와 0.1%의 교차반응을, Wyse 등(1979)의 경우 pantotheine과 0.3%가량의 교차반응을 보인 것보다 우수한 결과이다.

나. 미생물법 (microbiological assay, MBA)

(1) 표준곡선

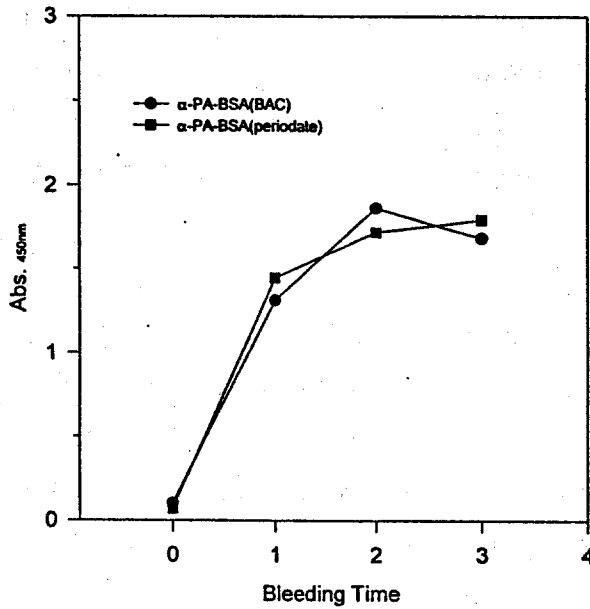


Fig. 1-20. Production of antibodies by immunizing rabbits with pantothenic acid-BSA. Bleeding is done after 1 week immunization.

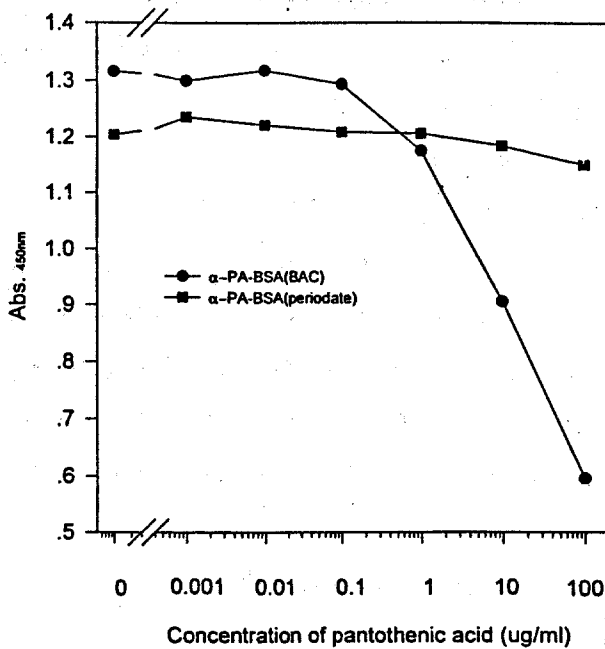


Fig. 1-21. Standard curves for pantothenic acid. Plate was coated at 10ug/ml with pantothenic acid-BSA(per).

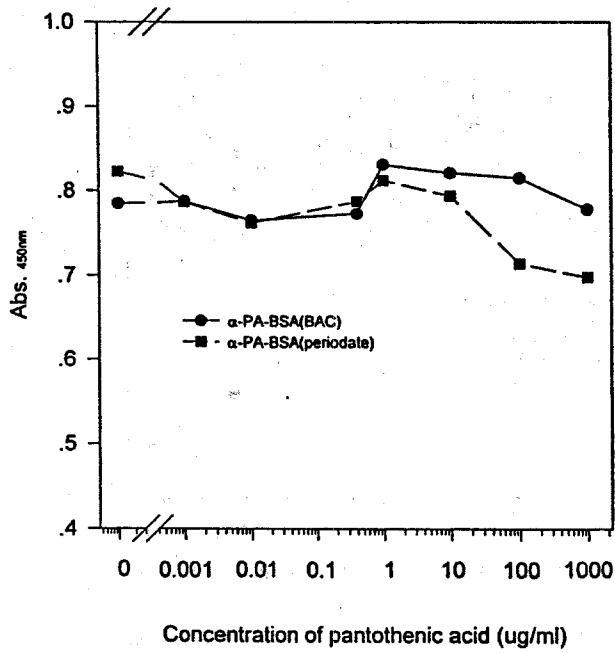


Fig. 1-22. Standard curves for pantothenic acid. Plate was coated at 10ug/ml with pantothenic acid-BSA(BAC).

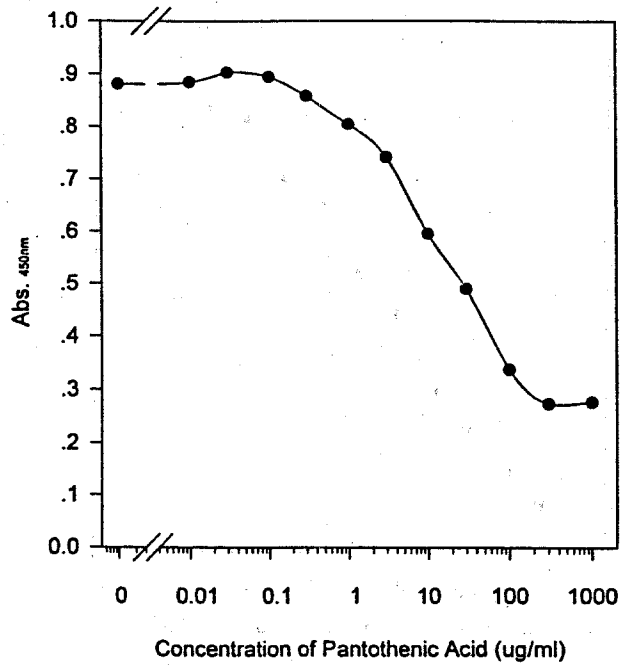


Fig. 1-23. Standard curve for pantothenic acid determined by ciELISA. Plates were coated at 10ug/ml with pantothenic acid-BSA(per).

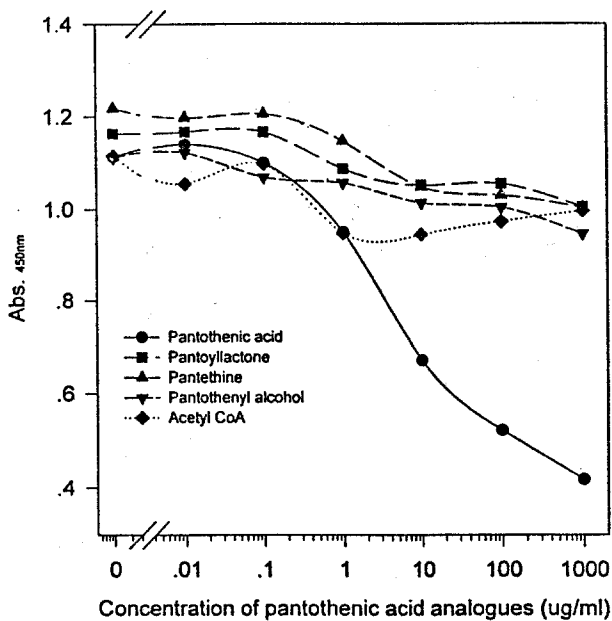


Fig. 1-24. Cross-reactions between various pantothenic acid analogues and specific antibodies by ciELISA. Plate was coated at 10ug/ml with pantothenic acid-BSA(per.).

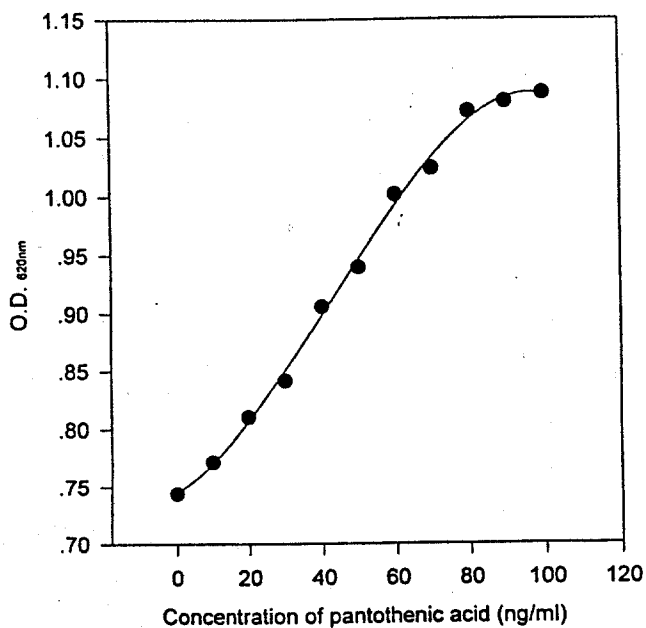


Fig. 1-25. Standard curve for pantothenic acid assay using *Lactobacillus plantarum* referred to AOAC method. One ml of pantothenic acid solution was added to assay medium whose final volume was 10ml.

한편, 종래의 *Lactobacillus plantarum*을 이용한 미생물배양에 의한 MBA법은 Fig. 1-25의 표준곡선에서와 같이 10 ppb (10ng/ml)의 양호한 검출감도를 보였다. 그러나, 이 방법은 분석시간이 많이 (24시간이상) 걸리는 단점이 있었다.

(2) MBA법에 의한 시료의 분석

식품시료로 식빵, 계란, 상추, 소간을 사용하여 pantothenic acid를 분석하였을 때의 결과를 Table 1-10에 나타내었다. 대체로 표준분석치와 유사한 결과를 보였으나 계란의 경우 2배 가량의 높은 분석결과를 나타냈는데, 이는 아마도 분석에 사용한 계란은 영양란의 난황이었으며, 보통란보다 사양관리를 잘 하여 pantothenic acid의 함량을 높였기 때문으로 생각된다.

다. ELISA에 의한 시료의 분석

식품시료로 계란, 상추, 소간을 사용하여 pantothenic acid를 분석하였을 때의 결과를 MBA법의 결과와 비교하여 Table 1-11에 나타내었다. 계란과 소간의 분석 회수율은 각각 109% 및 64%로 비교적 양호하였으나 상추의 경우 ELISA결과가 MBA결과에 비하여 10배가량의 높은 수치를 나타내었다. 이는 시료의 분석시 전처리한 용액을 직접 분석에 사용하여 얻은 결과였는데 시료유래의 물질에 의한 방해작용 때문으로 생각된다. 따라서, 전처리한 용액을 더욱 희석하여 ELISA를 행하였으나, 이 경우에는 표준곡선상의 검출감도범위를 벗어나 분석이 불가능한 문제가 있어 검출감도의 개선이 요구되었다.

3. 비타민 D의 검출법 개발

Table 1-10. Detection of pantothenic acid in food as assayed by microbiological assay (MBA)

Sample	MBA (mg/100g)	Food Tables (mg/100g)	Recovery MBA / Food Table (%)
Bread	0.35	0.3	117
Egg yolk ¹	4.2	1.8	233
Liver (cow)	7.2	8.2 ²	88
Lettuce	0.32	0.2	160

¹from nutrition-fortified egg

²Lamb's liver

Table 1-11. Detection of pantothenic acid in food as assayed by ciELISA

Sample	ELISA				MBA (mg/100g)	Recovery ELISA/MBA (%)	
	Dilution ratio	A ₄₅₀	Detected (ug/ml)	Corr. factor ¹			Assayed (mg/100g)
Egg yolk ²	5/100	0.855	2.3	2	4.6	4.6	109
Liver (cow)	"	0.854	2.3	2	4.6	7.2	64
Lettuce	"	0.901	1.3	2	2.6	0.32	813

¹ug/ml --> mg/100g

²from nutrition-fortified egg

가. 면역원의 제작

비타민D₂와 비타민D₃는 steroid부분이 공통구조를 갖고 있으며, ergosterol은 비타민D의 전구체로 (provitamin D)로서 UV를 조사하면 비타민D로 전환되므로 (Fig. 1-3), ergosterol을 시작물질로 하여 면역원을 제작하였다.

(1) Hapten의 처리

우선, 다음과 같이 ergosterol을 처리후 22번 탄소위치를 aldehyde로 전환시켰다 (Fig. 1-7).

(가) Ergosterol을 acetylation에 의하여 ergosterylacetate로 전환: Ergosterol을 pyridine 용매하에서 acetic anhydride로 상온에서 하룻밤 방치하여 반응시키고 물로 희석하여 benzene으로 추출한 다음, 1N HCl, 증류수, 포화NaHCO₃ 그리고 포화NaCl용액의 순서로 세정하고, 증발시켜 semisolid residue상태의 ergosteryl acetate를 얻었다.

(나) Ergosteryl acetate의 5,7-diene group보호를 위하여 cycloadduct로 만들: Ergosteryl acetate를 CHCl₃에 녹여 -70°C의 dry acetone에 녹인 4-phenylurazole에 합하고 그 온도에서 3시간 교반하고, alumina (grade V)를 가하고 1.5시간 더 교반하였다. 여과하고 용매를 증발시키면 기름처럼 되는데 이를 benzene에 녹이고 방치함으로써 반응하지 않은 4-phenylurazole의 결정을 제거하였다. Benzene을 증발시키면 짙은 오렌지색의 기름이 되는데, ether를 가하여 잘게 부수어 고형화하였다. Ether를 증발시키고 더 많이 생성된 결정을 ethanol에서 재결정하여 무색 침상의 cycloadduct를 얻었다.

(다) Cycloadduct를 ozonolysis에 의하여 20-aldehyde로 만들: Cycloadduct를 methylene chloride와 methanol의 혼합물에 녹이고 dry ice-acetone을 이용하여 -70°C를 유지하면서 ozonization시켰다. 이때

ozone의 유속은 약 0.1mmol/min으로 하였다. Ozonide가 생긴 용액을 질소가스로 purging하고, ozonide를 환원절단하여 aldehyde로 바꾸기 위하여 hexamethyl triaminophosphine을 가하고 -70°C를 유지하면서 교반하였다. 다음으로 얼음으로 희석하고 ether로 추출하였다. 5% HCl과 물로 세정하고 건조한 다음 TLC로 반응하지 않은 cycloadduct로부터 분리하였다. 반복 재결정화하여 20- aldehyde를 얻었다.

(라) 20-aldehyde에 amino기를 부착 및 활성화

20-aldehyde를 ethylenediamine (또는 ammonia)와 반응시켜 amino기를 부착시키고, LiAlH₄를 처리하여 deblocking시킨 다음 UV 조사 및 열처리로 활성형 Vit.D의 hapten처리를 완료하였다.

(2) Conjugation

앞에서 준비한 hapten의 amino기를 carrier protein인 BSA의 carboxyl기에 결합시키기 위하여 WSC (water soluble carbodiimide) 방법을 사용하였다. 즉, EDPC 존재하에 이들을 반응함으로써 활성형 Vit.D-BSA conjugate를 준비하였다. 탈염후 면역원으로 사용하였다.

나. 항체의 생산

위에서 제조한 면역원 500 μ g을 Freund's complete adjuvant (FCA)와 동량비로 혼합하고 유탁액을 만들어 토끼 뒷발바닥에 마리당 1ml씩 피하주사하였다. 2주일 후 FCA대신 Freund's incomplete adjuvant (FIA)를 사용하여 추가 면역을 실시하였다. 면역 1주일 후, 토끼의 귀정맥으로부터 채혈하여 항혈청을 분리하였다. 항체의 역가는 비경합 ELISA에 의해 측정하였다. 즉 microplate의 well당 2 μ g/ml의 Vit.D-BSA를 100 μ l씩 coating한 후, 희석한 항혈청을 처리하고 goat anti-rabbit IgG-HRP를 반응시킨 후, 기질용액(TMB)을 첨가하여 효소반응시킨 다음, 450nm에서 발색의 정도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1-26에 나타난 바와 같이 비경합 ELISA의 결과

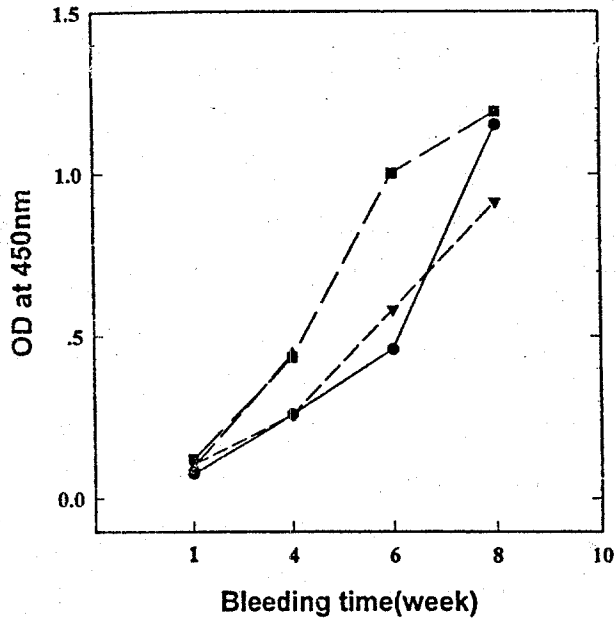


Fig. 1-26. Production of anti-vit.D antibodies by three rabbits immunized with vit.D-BSA conjugate on week 0, 3, 5, and 7, and bled once every week after immunization.

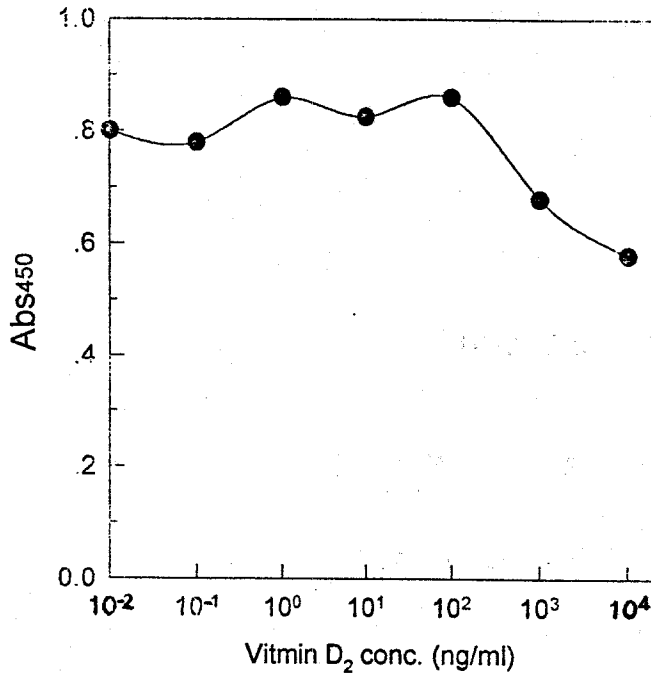


Fig. 1-27. Competition pattern of ciELISA for vitamin D₂.

로 부터 수차례 면역후의 항체가를 높아졌음을 확인하였다.

다. 경합 ELISA

앞에서 생산한 특이항체는 면역원인 Vit.D-BSA에 대하여 반응하였지만, 실제로 hapten인 Vit.D에 대하여 반응하는지를 조사하기 위하여 간접 경합 ELISA (ciELISA)를 실시하였다. 그 결과, Fig. 1-27에 나타난 바와 같이 1mg/ml이상 높은 농도의 Vit.D에 대하여만 약간의 경합이 보일 뿐 저 농도에서는 거의 경합이 일어나지 않았다. 또한, 정제한 특이항체 및 Vit.D-HRP conjugate를 이용한 직접경합 ELISA (cdELISA)에서도 경합현상을 보이지 않았다. 이는 아마도 면역원으로 사용한 conjugate에 문제가 있어서 결과적으로 carrier protein인 BSA에 대한 항체가 많이 생산되었고, 원하는 hapten인 Vit.D에 특이적인 항체가 생산되지 않은 것으로 추측된다. 따라서, 유기화학반응분야의 전문가인 KIST 유재훈 박사팀의 자문과 협조를 받아 재차 처음부터 hapten처리를 실시하고 있으며 각 단계마다 확실한 구조확인을 병행하고 있다. 이에 따라 이 부분의 연구가 지연되고 있으나 현재의 문제를 극복하고 조만간 양호한 결과를 얻을 수 있으리라 생각한다.

제 4 절 참고문헌

한국인구보건연구원 : 한국인의 영양 권장량, 한국인구보건연구원 편집 (1989).

농촌영양개선연구원 : 식품 성분표, 농촌영양개선연구원 편집 (1991).

American Academy of Pediatrics (AAP) : Commentary on breast feeding and infant formulars, including proposed standards for formulas. *Pediat.*, 57, 278-285 (1976).

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Prober, J. : *Cellular and Molecular Immunology*. ed. W. B. Saunders comp. (1991).

Adesiyun, A. A., Eschbach, M., Lenz, W. and Schal, K. P. : Detection of enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains - A comparative use of the modified outchterlony precipitation test, reversed passive latex aggregation test, and avidin-biotin ELISA. *Can. J. Microbiol.*, 38, 1097-1101 (1992).

Alcock, S. A., Finglas, P. M. and Morgan, M. R. A. : Production and purification of R-protein-enzyme conjugate for use in a microtitration plate protein-binding assay for vitamin B₁₂ in fortified food. *Food Chemistry*, 45, 199-203 (1992).

Association of Official Analytical Chemists : *Official Methods of Analysis*. 15th ed., Arlington, Virginia (1990).

Baker, H. : Assessment of biotin status - Clinical implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 447, 129-132 (1985).

Bannister, D. W. : The biochemistry of fatty liver and kidney syndrome. *Biochem. J.*, 156, 167-173 (1976).

Baugh, C. M., Malone, J. W. and Butterworth, J. : Human biotin deficiency - A case history of biotin deficiency induced by raw egg consumption in a cirrhotic patient. *Am. J. Clin. Nutr.*, 21, 173-182 (1968).

Bayer, E. A. and Wilchek, M. : Avidin-biotin technology. pp 137-162 in Mansom, M., *Methods in molecular biology*. vol. 10 : Immunochemical protocols. ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ (1992)

Bendich, A. and Cohen, M. : B Vitamins - Effects on specific and nonspecific immune responses. pp 101-124 in Chandra, R. K., *Nutrition and immunology*. ed., Alan R. Liss, Inc., New York (1988).

Bitsch, R., Salz, I. and Hötzel, D. : Biotin assessment in foods and body fluids by a protein-binding assay(PBA). *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 59, 59-64 (1989).

Bonjour, J. P. : Biotin. pp 393-427 in Machlin, L. G., *Handbook of vitamins*. ed., Marcel Dekker, New York (1991).

Bonjour, J. P. : Biotin in human nutrition. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 447, 97-104 (1985).

Bonjour, J. P. : Biotin in man's nutritional and therapy. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 47, 107 (1977).

Brock, P. H. and Medigan, M. T. : Immunology and Immunity. pp 426-468 in *Biology of microorganisms*. 6th ed., Prentice-Hall International (1991).

Caryn, R. K. and Hood, R. L. : The biotin content of Australian bread and crumpets. *Australian J. Nutr. Dietet.*, 49(3), 85-86 (1992).

Chastein, J. L., Komro, D. M. B. and McCormick, D. B. : High performance liquid chromatography of biotin and analogues. *J.*

Chromatog., 330, 153-158 (1985).

Cooper, H. M. and Paterson, Y. : Production of antibodies. in *Current protocols in immunology*. ed., John Wiley and Sons, New York (1991).

Cox, J. C. and Longoria, C. C. : Some observation on a new filter pad technique for the estimation of avidin and biotin. *Microchem. J.*, 41, 41-47 (1990).

Desbene, P. L., Custal, S. and Frappier, F. : Separation of biotin and its analogs by high performance liquid chromatography - Convenient labeling for ultraviolet or fluorimetric detection. *Anal. Biochem.*, 128, 359-362 (1983).

DIFCO : Media for microbiological assay of vitamins and amino acids, in *Difco's Technical Information 1977*. Difco Lab., Detroit, MI. (1977)

Favell, D. J. : Vitamin analysis - Microbiological methods. *J. Micronutr. Anal.*, 7, 237-246 (1990).

Finglas, P. M. and Morgan, M. R. A. : Application of biospecific methods to the determination of B-group vitamins in food. *Food Chemistry*, 49, 191-201 (1994).

Finglas, P. M. and Morgan, M. R. A. : The determination of vitamins in food by biospecific analysis. *Int. Indust. Biotechnol.*, 8(3), 9-12 (1988).

Finglas, P. M., Faulks, R. M., Morris, H. C., Scott, K. J. and Morgan, M. R. A. : The development of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the analysis of pantothenic acid and analogues, part II -

Determination of pantothenic acid in foods. *J. Micronutr. Anal.*, 4, 47-59 (1988).

Finglas, P. M., Faulks, R. M. and Morgan, M. R. A. : The analysis of biotin in liver using a protein-binding assay. *J. Micronutr. Anal.*, 2, 247-257 (1986).

Foldin, N. W. : Micronutrient supplements - Toxicity and drug interactions. *Progress in Good and Nutrition Science*, 14, 277-331 (1990).

Friedrich, W. : Biotin. pp 755-805 in *Vitamins*. ed., Walter de Gruyter, Berlin · New York (1988).

Frutos, M. and Regnier, F. E. : Tandem chromatographic immunological analyses. *Anal. Chem.*, 65(1), 17A-25A (1993).

Gonzalez, I. and Martin, R. : Polyclonal antibodies against live cells of *Pseudomonas fluorescences* for the detection of psychrotic bacteria in milk using a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Dairy Sci.*, 77, 3552-3557 (1994).

Green, N. M. : Avidin. *Adv. Protein Chem.*, 29, 85-133 (1975).

Green, N. M. : A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin. *Biochem. J.* 94, 23c-24c (1965).

Green, N. M. : Spectrophotometric determination of avidin and biotin. pp 418-430 in McCormick, D. B. and Wright, L. D., *Methods Enzymol.*, 18, part A (1970).

Gretch, D. R., Suter, M. and Stinski, M. F. : The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin affinity chromatography to isolate herpesvirus hydrophobic proteins or glycoproteins. *Analy. Biochem.*, 163, 270-277 (1987).

Guilarte, T. R. : Analysis of biotin levels in selected foods using a radiometric-microbiological method. *Nutr. Rep. Int.*, 32(4), 837-845 (1985).

Haarasilta, S. : Enzymatic determination of Biotin. *Anal. Biochem.*, 87, 306-315 (1978).

Harlow, E. and Lane, D. : *Antibodies*. ed., Cold Spring Harbor, New York (1988).

Hansen, T. J. : Immunochemical methods for mycotoxin detection in food products. *Trends Food Sci. Technol.*, 1, 83-88 (1990).

Henz, N. G. and Bachas, L. G. : Class-selective detection system for liquid chromatography based on the streptavidin-biotin interaction. *Anal. Chem.*, 67, 1014-1018 (1995).

Hood, R. L. and Johnson, A. R. : Supplementation of infant formulations with biotin. *Nutr. Rep. Int.*, 21(5), 727-731 (1980).

Hood, R. L. : A radiochemical assay for biotin in biological materials. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1847-1852 (1975).

Hood, R. L. : The use of linear regression analysis in the isotope dilution assay of biotin. *Analy. Biochem.*, 79, 635-638 (1977).

Hoppner, K. and Lampi, B. : The biotin content of breakfast cereals. *Nutr. Rep. Int.*, 28, 793-798 (1983).

Hoppner, K. and Lampi, B. : Contribution of some fast food meals to the daily intake of pantothenic acid and biotin. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 20(3), 173-175 (1987).

Hoppner, K. and Lampi, B. : Total folate, pantothenic acid and biotin in some fish products. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 22(2), 170-172 (1989).

Hoppner, K. and Lampi, B. : Total folate, pantothenic acid and biotin content of yoghurt products. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 23(4/5), 223-225 (1990).

Hoppner, K. and Lampi, B. : Biotin content of cheese products. *Food Res. Int.*, 25, 41-43 (1992).

Hoppner, K., Lampi, B. and O'Grady, E. : Biotin content in vegetables and nuts available on the canadian market. *Food Res. Int.*, 27, 495-497 (1994).

Hudson, T. S., Subramanian, S. and Allen, R. J. : Determination of pantothenic acid, biotin, and vitamin B₁₂ in nutritional products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67(5), 994-998 (1984).

Johnson, A. R. and Hood, R. L. : Biotin and the sudden infant death syndrome. *Nature*, 285, 159 (1980).

Laemmli, U. K. : Cleavage of structural protein during assembly of the

head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).

Lee, H. A., Mills, E. N. C., Finglas, P. M. and Morgan, M. R. A. M. : Rapid biospecific methods of vitamin analysis. *J. Micronutr. Anal.*, 7, 261-270 (1990).

Livanlou, E., Evangelatos, G. P. and Ithaksslos, D. S. : Biotin radio-ligand assay with an ^{125}I -labeled biotin derivative, avidin and avidin-double antibody reagents. *Clin. Chem.* 33(11), 1983-1988 (1987).

Lumley, I. D. and Lawrance, P. R. : Advances in the determination of vitamins in foodstuffs - Methods used at the laboratory of the government chemist. *J. Micronutr. Anal.*, 7, 301-313 (1990).

Machlin, L. J. : *Handbook of vitamins*. 2nd ed., Marcel Dekker, New York and Basel (1991).

Marshall, M. W., Judd, J. T. and Baker, H. : Effects of low and high-fat diets varying in ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids on biotin intakes and biotin in serum, red cells and urine of adult men. *Nutr. Res.*, 5, 801-814 (1985).

Miller, D. R. and Hayes, K. C. : Vitamin excess and toxicity, pp81-134 in Hatchcock, J. H., *Nutritional toxicology*(vol. 1). ed., Academic Press, New York (1982).

Moll, E. and Shive, W. : Assay for biotin in the presence of dethiobiotin with *Lactobacillus plantarum*. *Anal. Biochem.*, 158, S55-58 (1986).

Morgan, M. R. A. : Newer techniques in food analysis - Immunoassays

and their application to small molecules. *J. Assoc. Publ. Anal.*, 23, 59-63 (1985).

Morris, B. A. and Clifford, M. N. : *Immunoassays in food analysis*. Elsevier Applied Science, London (1985).

Morris, H. C., Finglas, P. M., Faulks, R. M. and Morgan, M. R. A : The development of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the analysis of pantothenic acid and analogues, Part 1 - Production of antibodies and establishment of ELISA system. *J. Micronutr. Anal.*, 4,33-45 (1988)

Odunfa, S. A. : Microbiological assay of vitamin B and biotin in some Nigerian fermented foods. *Food Chemistry*, 19, 129-136 (1986).

Ohsugi, M., Imanishi, Y., Teraoka, T., Nishimura, K. and Nakao, S. : Biosynthesis of biotin-vitamers by Family Enterobacteriaceae. *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, 36, 447-456 (1990).

Pestka, J. J. : Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *J. AOAC Int.*, 71, 1075-1081 (1988).

Polesello, A. and Rizzolo, A. : Application of HPLC to the determination of water soluble vitamins in foods. *J. Micronutr. Anal.*, 8, 105-158 (1990).

Reichart, N. und Rubach, K. : Bestimmung von Biotin und Folsäure in vitaminisierten Lebensmitteln mittels kompetitivem bindungs protein assay(CBPA) und ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay). *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 187, 341-345 (1991).

Robert, M. : HPLC determination of vitamins. *J. Micronutr. Anal.*, 7, 247-260 (1990).

Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. : *Immunology*. ed., Gower Medical Publishing, London · New York (1985)

Shon, D. H., Han, S. M., Lee, Y. W., Cho, S. H., Kang, S. Y. and Lee, K. A. : Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of fumonisin. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(1), 119-125 (1996).

Shon, D. H., Park, A. P., Seo, B. C., Kim, J. C., Lee, Y. W., Nam, Y. J. and Hawer, W. D. : Development of a enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of aflatoxin B₁. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20(2), 225-232 (1996).

Stein, J., Hahn, A., Lembcke, B. and Rehner, G. : High performance liquid chromatographic determination of biotin in biological materials after crown ether-catalyzed fluorescence derivatization with panacyl bromide. *Anal. Biochem.*, 200, 89-94 (1992).

Sweetman, L. : Two forms of biotin responsive multiple carboxylase deficiency. *J. Inherited Metab. Dis.*, 4, 53-54 (1981).

The National Research Council : *Recommended Dietary Allowances*. 10th ed., National Academy of Science, Washington, D. C. (1989).

Vanderlaan, M., Stanker, L. and Watkins, B. : Immunoassays for chemical residues in food and the environment. pp1-13 in *Immunoassays for chemical residues in food and the environment*. ed., American Chemical

Society (1991).

Voigt, M. N., Eltenmiller, R. R. and Ware, G. O. : Vitamin assay by microbial and protozoan organisms - Response to vitamin concentration, incubation time and assay vessel size. *J. Food Sci.*, 43(5), 1418-1423 (1978).

Water, C. V. and Haagsma, N. : Sensitive streptavidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of chloramphenicol residues in swine muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73(4), 534-540 (1990).

Wilson, J. and Lorenz, K. : Biotin and choline in foods -Nutritional importance and methods of analysis. *Food Chem.*, 4, 115-129 (1979).

Wolf, B. and Feldman, G. L. : The biotin dependent carboxylase deficiencies. *Am. J. Human Genet.*, 34, 699-716 (1982).

Bertelsen, G., Finglas, P. M., Loughridge J., Flulks R. M. and M.R.A. Morgan. (1988). Investigation into the effects of conventional cooking on levels of thiamin(determined by HPLC) and pantothenic acid (determined by ELISA) in chicken. *Food Sciences and Nutrition* 42F: 83-96.

Wyse, B. W., Wittwer, C. and R. Gaurth Hansen. (1979). Radioimmunoassay for pantothenic acid in blood and other tissues. *Clin. Chem.* 25(1): 108-111.

Walsh, J. H., Wyse, B. W. and R. Gaurth Hansen. (1979). A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods. *J. of Food Biochemistry* 3: 175-189.

Hermanson, G. T., Mallia, A. K. and Paul K. Smith. (1992). Immobilized affinity ligand techniques pp. 69-76, Academic Press

Iyer, K. S. and Werner A. Klee. (1973) Direct spectrophotometric measurement of the rate of reduction of disulfide bonds. *The Journal of Biological Chem.* 248(2): 707-710.

Airas, R. K. (1983). Pantothenase-based assay of pantothenic acid. *Anal. Biochem.* 134: 122-125.

여 백

비육류 단백질의 분석법 개발 (세부과제-2)

Development of Systems for the Speciation of
Non-Meat Proteins

1998. 12. 20

연구기관

한국식품개발연구원

여 백

제 3 장 비육류 단백질의 분석법 개발

제 1 절 서 설

비육류단백질 (특히, 대두, 밀, 우유, 계란 단백질)은 가공육 등의 식품에 첨가되는 것으로서 'binder'(결착제: 전체 중량비로 3.5%까지 첨가시)나 'extender'(증량제: 전체 중량비로 10%까지 첨가시)로 불리며, 경우에 따라서 때때로 'filler', 'emulsifier', 또는 'stabilizer'로도 불린다. 비육류단백질의 사용은 물성의 개량 등 여러 이유로 사용되는데, 많은 경우 이런 특징들은 생산자의 원가절감에 기여한다. 왜냐하면, 가공육제품에 값싼 육류나 단백질의 사용이 가능하기 때문이다. 비육류단백질의 사용은 경제성 향상에 명백히 기여함. 근년 증량제의 사용이 급증하고 있다. 식품 중 비육류단백질의 검출과 정량은 육가공품이 식품규정에 합당한지, 그리고 식품알레르기 (주로 식품단백질에 대한 생체의 과민반응으로서 이들 물질에 특이적인 IgE항체가 mast cell과의 작용으로 염증매개물질 [히스타민 등]을 과다하게 분비하므로써 생기는 이상현상) 환자의 식이조절과 관련하여 매우 중요하다.

비 면역학적 방법에 의한 비육류단백질 첨가물의 검출으로 현미경 관찰법, 전기영동법 (SDS-PAGE 등) 등이 있으나, semi-quantitative, 장시간, 노동, 저감도 등의 문제가 있다. 아미노산분석으로는 정확한 식별이 곤란하며, HPLC는 분석비용이 많이 들고 특이성이 떨어지는 문제가 있다. 또한 NIR에 의한 방법이 최근 보고되고 있으나, 일반적인 분석법으로는 아직 개발되지 않은 상태이다.

면역학적 방법은 항체를 이용함으로써 특이성 및 감도가 매우 우수한 방법이다. 질병진단분야에 20여 년 전부터 활용되기 시작하였으며, 식품엔 근년에 시도되고 있다. 그러나 여러 식품중엔 각기 다른 여러 성분이 혼재

하여 분석에 장애요인이 되므로 이를 극복하는 연구가 필요하다. 즉, pH, 지방, 염의 조건이 각기 다르고, 그에 따른 시료의 처리방법이 가구되어야 하며, 가열 (물리적 변화에 의한 특정항원의 항원성의 상실 또는 변화)에 의한 변화에도 분석이 가능하여야 한다. ELISA의 방식은 앞의 미량비타민 분석법의 경우와 기본적으로 같으나, 단백질은 그 자체가 면역원성이 강하므로 항체생산을 위하여 hapten-carrier protein conjugate를 별도로 제작할 필요가 없는 점이 가장 큰 차이점이다. 비육류 단백질인 대두, 우유, 계란, 밀 등에 대한 면역화학적 분석법의 개발현황은 다음과 같다.

대두 단백질 분석법에 관하여 살펴보면 다음과 같다. 대부분 품종의 대두는 건물량의 40%가 단백질이며, 그 저장단백질이 식품에 활용된다. pI는 4.5-5.0이다. 대두로부터 두부나 단백질 curd의 생산시 부산물로 나오는 유청은 별도로 식품에 활용하지 않고 있으나, 이에는 trypsin inhibitor, hemagglutinin 등의 단백질을 함유하고 있다. 대두단백질의 70%를 차지하는 주성분은 glycinin과 beta-conglycinin이다. Glycinin (11s globulin, 분자량 300-350kDa, 12subunit로 구성, 51%)과 beta-conglycinin (7s globulin, 당단백질, 분자량 150-175kDa, 3subunit로 구성, 19%)이 주요성분이다.

열처리의 문제가 가장 중대한 분석의 장애요인이 되는데, 11s는 열에 비교적 안정하여 섭씨 117도 처리에도 안정하다. 그러나 이에 대한 분석만 으론 분석의 오류를 범할 가능성이 있다. 따라서, 이와 함께 7s 등 타성분의 분석을 고려할 필요가 있다. Hemagglutinin은 열에 불안정하므로 좋은 검출대상이 아니다. ELISA에서 Hitchcock 등은 대두함유시료의 추출시 뜨거운 urea 용액과 mercaptoethanol (ME)를 사용하고, 이어서 중성완충액으로 100배 희석한 다음, ELISA를 행함으로써 상당히 좋은 분석결과를 보였다. 그후 Ritteburg 등이 이를 개선하여 환원조건하 추출한 후, urea하에서 끓이고 cystine함유 완충액으로 'renaturation'한 다음 분석하여 만족스러운 정도로 높은 회수율을 얻고 있다.

Ravestein 등은 nitricellulose법 (western blot방식)으로 분석하였는데, ME 및 SDS가 함유된 buffer로 추출후 marker로 11s의 'A1' subunit(열안정성 높음)를 이용하였다. 이 경우 다른 두류와의 교차반응 극히 낮으며, 0.5% 대두단백첨가시의 분석이 가능한 것으로 나타났다. Janssen은 Dot-blotting법으로 분석하였을 때 대두단백이 생육류와 먼저 혼합된 후에 가열한 경우는 대두단백질의 검출이 어려웠다. 이는 효소적 modification의 결과로 추정된다. 따라서, 이에 대한 추가 검토가 필요하다. 이러한 연구결과에 힘입어 최근에는 미국의 AOAC, 영국의 Association of Public Analysis, 기업체/정부 연구소에서 공식적인 대두단백질의 새로운 분석법으로서 ELISA를 인정하고 있다.

우유 단백질의 면역분석법에 대하여 살펴보면 다음과 같다. 우선 casein은 monomer의 분자량이 20-30kDa이고, 우유단백질의 80%를 차지한다. Ca결합성 인단백질이며, 우유중 colloidal aggregate형성하여 존재한다. 4종류 subunit로 나뉘지는데 alpha s1, alpha s2, beta, kappa-casein이다. 치즈제조에 부산물로 나오는 유형에 주로 함유된 whey protein에는 beta-lactoglobulin (분자량 18.3kDa, 9%, 열에 매우 불안정)과 alpha-lactalbumin (분자량 14.4kDa, 3%), serum albumin (분자량 67kDa, 1%), immunoglobulin (분자량 160kDa, 2%) 등이 있다.

면역학적 검출은 육가공품중의 casein검출에 매우 효과적이다. 그러나, 가수분해된 우유의 검출은 항원성의 파괴로 인하여 검출이 곤란한 문제가 있다. Teufel은 sandwich ELISA로 소시지 추출물에 적용하였는데, 회수율이 낮게 나타났다. Staak는 추출효율의 개선을 위해 소시지의 항체흡수 방법을 활용하였으며, Rittenburg는 항체를 코팅하고 enzyme-casein conjugate를 사용함으로써 신속하게 검출하는 방법을 개발하였다. 한편, Heppel은 가열시 항원성의 감소를 보고하였는데, 이는 밀단백질의 경우와 대조적이다.

계란 단백질의 분석법에 대하여 살펴보면 다음과 같다. 우선 계란의

난백은 전체 중량의 10%가 단백질이다. 그중 약 절반이 ovalbumin (분자량 45kDa, 열불안정)이며 이는 수분보지력을 상승시켜 증량증가효과가 크므로 식품에 다양하게 활용되고 있다. 다음으로 10-12%가 ovomucoid (당단백, 분자량 28kDa, 주요 알레르겐), ovotransferrin (conalbumin, 분자량 76.6kDa, 철결합), 그외 ovomacroglobulin, ovomucin, lysozyme (분자량 15kDa) 등이다.

최근 식품알레르기과 관련하여 검출의 필요성이 높아지고 있다. Hauser는 immunodiffusion method의해 육가공품중 비가열처리된 계란이나 계란분말 유래의 계란단백질을 검출하였는데, 고온처리의한 가공시는 검출이 안되는 문제가 있었다. 기타의 여러 면역학적 방법 활용에서도 그다지 효과적이 아니었다. 최근 Breton는 EIA 및 SDS-PAGE후 immunoblotting에 의하여 버섯통조림중 계란 단백질의 검출을 시도하였다.

본 연구에서는 국내에서 연구가 부진한 대두, 우유, 계란 등 비육류 단백질의 분석법을 개발함으로써 식품과학과 식품산업에 이를 활용하고자 특이항체의 생산 및 시료의 처리조건 확립, ELISA의 조건확립을 목적으로 다음과 같은 연구를 수행하였다.

제 2 절 방 법

1. 대두단백질의 검출법 개발

가. 대두단백질의 준비

(1) 11S acidic subunits의 분리

시판의 생콩가루(오대산자연식품)를 soxhlet장치를 이용하여 hexane으로 탈지하고 풍건하여, 약 72g의 탈지대두분말을 얻었다. 이중

11S globulin (glycinin)을 Iwabuchi 등의 방법을 변형하여 분리, 정제하고, Superose 12 column을 이용하여 정제하였다. 다음으로 11S acidic subunits (AS) 및 basic subunit (BS)를 분리하기 위하여 Laemmli의 방법으로 12.5%의 SDS-PAGE를 실시한 뒤 AS밴드로부터 단백질을 회수하고 물로 4°C에서 2일간 투석 후 동결·건조하였다. 또한, R. B. Iyengar 등의 방법으로 DTT (dithioerythritol) 및 IAA (iodoacetamide)를 이용하여 각각 11S 단백질을 환원 및 변형한 후, 음이온교환칼럼에 의해 각 subunits의 분리정제를 시도하였다.

(2) 분리대두단백의 준비

분리대두단백 (ISP)은 (주)두솔산업사로 부터 구입한 Supro 500E (Protein Technologists International Co., Checkerboard Square, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 이 ISP 100g을 2L의 0.03M Tris-Cl buffer (pH 8.0), 0.01M 2-mercaptoethanol (2-ME)에 상온에서 용해시킨 다음, 4°C, 25,000xg에서 30분 원심분리하여 얻은 상정액을 동결건조하였으며, 이를 ISP(+ME)로 명명하였다. 한편, 이때 2-ME를 첨가하지 않은 buffer에 용해하여 얻은 것을 ISP(-ME)로 명명하였다.

나. 항체의 생산

대두단백질에 대한 특이항체의 생산을 위하여 위의 단백질을 PBS (0.25M Na_2HPO_4 , 0.25M NaH_2PO_4 , 0.75M NaCl, pH 7.2)에 바로 용해하여 면역하거나 SDS 등을 처리한 후 면역하였다. 즉, 앞에서 분리한 11S, AS, ISP(+ME), 그리고 ISP/SDS [ISP(+ME)를 SDS 0.5%, 2-ME 0.02%, urea 0.5% 함유한 PBS에 6mg/ml의 농도로 용해한 후 가열처리한 것]를 각기 2마리씩의 토끼 (New Zealand White)에 면역하였다. 이때 일회분의 면역원량은 500 μg 으로 하고 PBS에 용해시켜 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 피하주사하였다. 추가면역은 2-3주 간격으로 같은 방법으로 실시하였다. 단 이때는 incomplete adjuvant를 사용하였으며, 면역 후 1주 후 채혈하고 항혈청을 분리하였다. 특히, 항SP/urea항체는 Sigma사의 제품으로서

acetone 처리로 회수한 대두단백질을 뜨거운 urea로 처리한 다음 면역하여 얻은 항체를 정제한 것이다.

다. 항11S.AS항체-효소 복합체의 제조

Protein A column 및 Sephadex G-25를 이용하여 분리, 정제한 항 11S.AS항체 1mg (PBS buffer 0.5ml에 용해)을 CNBr activated HRP 1mg (증류수 100ul에 용해)과 혼합후, 여기에 환원제로서 10 ul의 5N sodium cyanoborohydride 용액 (1M NaOH에 용해)을 즉각 첨가한 다음 1시간 상온에 방치한다. 이어서 quenching buffer로서 20ul의 3M ethanolamine 용액 (pH 9.0)을 15분간 처리후, 탈염하고 50% glycerol하에 보관하면서 사용하였다.

라. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

항체의 역가는 비경합적 ELISA에 의하여 측정하였고, 대두단백질의 정량을 위하여, 간접 및 간접 경합 ELISA (ciELISA 및 cdELISA)를 사용하였다.

(1) ciELISA

ISP(+ME)를 2ug/ml의 농도로 coating buffer (0.02M Tris buffer 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 9.0)에 용해하고 각 well당 100 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하고, 3회 세척후, 적당배율로 희석한 항혈청과 대두단백질의 1:1 혼합액을 100 μ l씩 넣고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 3회 세척하고, 2차효소표식항체(goat anti-rabbit IgG-HRP, 1/10,000희석)로 실온에서 1시간 반응하였다. 3회 세척후, 기질용액 (H₂O₂/TMB)을 30분 처리후 1M H₂SO₄를 첨가하여 반응정지후 발색의 정도를 microplate reader로 450nm에서 측정하였다.

(2) cdELISA

경합반응시 항체대신에 앞에서 준비한 항11S.AS항체-효소 접합체를 이용함으로써 경합반응 이후의 2차항체 처리를 생략하는 점 이외에는 위의 ciELISA와 완전히 같다.

마. 교차반응

대두단백질이외의 단백질에 대한 특이항체의 반응성을 ELISA로 조사하였다.

2. 우유단백질의 검출법 개발

가. 우유단백질 α 1-casein의 분리

Crude α 1-casein을 urea의 존재하에서 NaCl 농도구배 0-0.4M로 처리한 DEAE-sephadex A-50 anion exchange chromatography를 행하여 분리한 후, 성분을 확인하기 위하여 SDS-PAGE와 은염색을 실시하였다.

나. 항체의 생산

정제한 α 1-casein을 면역원으로 하여 앞의 방법과 같이 토끼에 면역하여 항혈청을 분리하였다. 이와는 별도로 다른 유단백질인 α -lactoglobulin과 β -lactoglobulin에 대한 항혈청을 생산하였다.

다. 간접경합 ELISA (ciELISA)

α 1-casein의 정량을 위한 ciELISA의 조건을 확립하였다. 즉, 앞에서 분리한 α 1-casein을 20 μ g/ml 농도로 coating한 well에 특이항체와 유단백질을 1:1로 혼합하여 넣고서 경합반응을 시킨 다음 앞의 방법에 준하여 행하였다.

라. 교차반응

α 1-casein이외의 유단백질에 대한 특이항체의 반응성을 앞의 방법에 준하여 조사하였다.

마. 항체의 정제

Protein A mini-column (Pierce사)을 이용하여 α 1-casein에 대한 항체를 정제하였다.

바. 항체-효소 결합체의 준비

정제한 특이항체를 효소(horseradish peroxidase, HRP)와 EDPC법으로 결합시켰다.

사. Sandwich ELISA

정제항체를 희석하여 micoplate에 coating하고 α s1-casein을 반응시킨 후 항체-효소 결합체를 처리하고 기질반응시켰다.

아. 시료의 처리

유제품 시료를 생리식염수로 1/100가량 희석하여 ELISA에 사용하였다. 단, 고체시료는 믹서를 이용하여 잘 분산시킨 다음 하룻밤 4도에서 보존후 적당 배율로 희석하였다.

자. Spike test

우유시료의 희석액에 α s1-casein용액을 일정량 첨가하여 그 농도를 여러단계로 높이고 이에 대한 ELISA를 실시하였다.

3. 계란단백질의 검출법 개발

가. 항체의 생산

계란단백질에 대한 특이항체의 생산을 위하여 ovomucoid (OM)와 ovalbumin (OVA)를 Freund's adjuvant와 함께 토끼 (New Zealand White)에 면역하였다. 추가면역은 2-3주 간격으로 같은 방법으로 실시하였다.

나. 간접 경합 ELISA (ciELISA)

대두단백질의 정량을 위한 ciELISA의 조건은 다음과 같다. OM을 2ug/ml의 농도로 coating buffer에 용해하고 각 well당 100 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하고, 3회 세척후, 적당배율로 희석한 항혈청과 계란단백질의 1:1 혼합액을 100 μ l씩 넣고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 3회 세척하고, 2차효소표식항체(goat anti-rabbit IgG-HRP, 1/10,000희석)로 실온에서 1시간 반응하였다. 3회 세척후, 기질용액 (H_2O_2 /TMB)을 30분 처리후 1M H_2SO_4 를 첨가하여 반응정지후 발색의 정도를 microplate reader로 450nm에서 측정하였다.

다. 교차반응

OM이외의 단백질에 대한 특이항체의 반응성을 앞의 방법에 준하여 조

사하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 대두 단백질의 ELISA 개발

가. 대두단백질 면역원의 준비

(1) 11S, AS의 준비

대두단백질의 주요구성분의 하나인 11S, AS는 열에 안정하기 때문에 11S, AS에 대한 항체는 가공육 중에 포함된 대두단백질 검출에 효과적으로 활용가능하다 (Ravestain, 1986). 따라서, 11S, AS를 효율적으로 얻기 위하여 미변성 대두분말을 방법에서와 같이 처리하여 11S를 분리하였으며, 이를 Superose 12 column으로 정제하였다 (Fig. 2-1, A).

11S를 다시 AS와 BS로 분리하기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 뒤 AS 밴드로부터 단백질을 회수하였다. Fig. 2-1, B의 SDS-PAGE결과와 같이 각 성분이 순도높게 분리되어 있음이 확인되었다.

다른 한편으로, SDS-PAGE 이외에, 11S 단백질을 환원 및 변형한 후 음이온교환칼럼에 의해 11S, AS의 분리정제를 시도하였다 (Fig. 2-2, A). 그 결과, Fig. 2-2, B의 SDS-PAGE에서와 같이, AS의 분리가 양호하였다.

(2) 분리대두단백의 준비

분리대두단백 (ISP)은 가공식품의 부원료로 산업적으로 널리 사용되고 있기 때문에 이를 면역원으로 이용하기 위하여 다음 두 방법으로 ISP

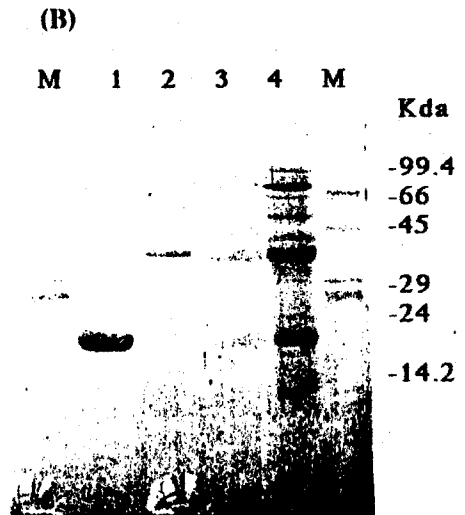
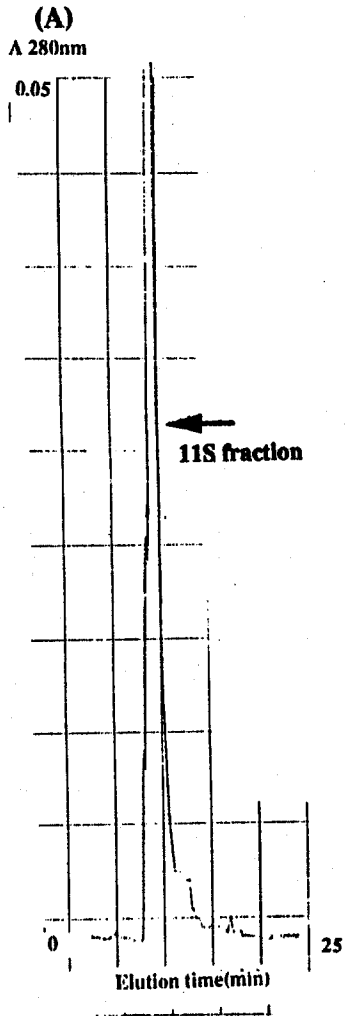


Fig. 2-1. Gel-filtration chromatogram of 11S fractions on Suprose 12 FPLC column (A) and SDS-PAGE patterns of soy proteins (B). M, molecular marker; 1, 11S basic subunits; 2, 11S acidic subunits; 3, 11S fraction; 4, whole soy proteins.

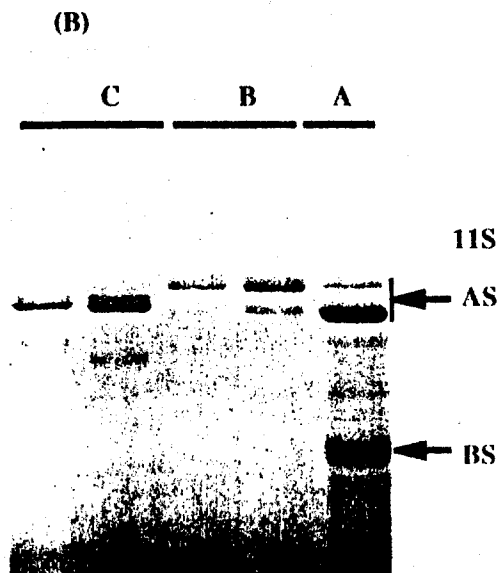
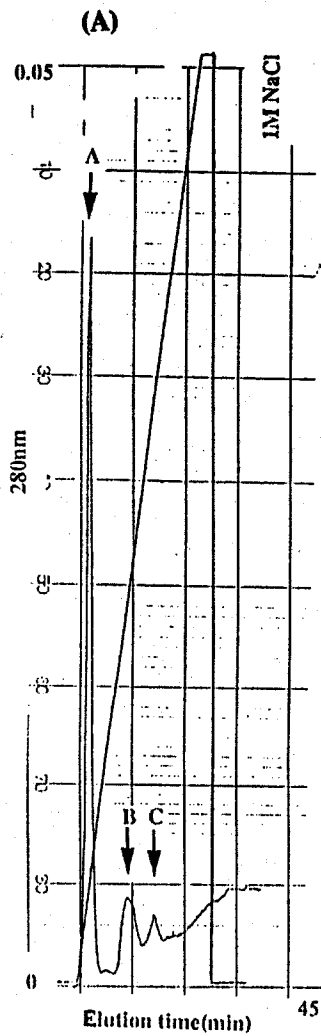


Fig. 2-2. Anion-exchange chromatogram of 11S acidic subunits on Resource 6 FPLC column (A) and SDS-PAGE patterns of the fractions (B). AS, acidic subunits; BS, basic subunits.

를 처리하였다. 즉, ISP를 2-ME가 들어 있는 완충액과 들어있지 않은 완충액에 각기 용해후 고속원심분리한 다음, 상정액의 동결건조를 행하였다. 이들을 각각 ISP(+ME), ISP(-ME)로 명명하였다.

나. 항체의 생산

앞에서 분리한 11S, AS, ISP(+ME), 그리고 ISP/SDS를 각기 두 마리의 토끼에 수차례 면역하였다. 면역 1주일후 체혈하고 분리한 항혈청을 1/20,000로 희석한 다음, 그 항체를 비경합 ELISA로 조사한 결과는 Fig. 2-3과 같다. 여기에서, 대체로 항11S, AS항체의 항체가 가장 뛰어났으며, 다음으로 항ISP/SDS항체, 그 다음으로 항ISP(-ME)항체의 순이었다. 각 면역원에 대한 항혈청중에서 가장 우수한 항혈청 lot를 하나씩 선발하여 (각기 #1-3, #1-2, #2-3) 다음의 ELISA에 사용하였다. 또한, Fig. 2-3에서 항SP/urea항체는 뜨거운 urea로 처리한 대두단백질에 대한 정제항체로서, 본 실험에서 생산한 항체와의 비교를 위하여 사용하였다.

다. ciELISA

앞에서 준비한 ISP(+ME)의 용해성이 우수하고 다량 확보하였기 때문에 기준 대두단백질로서 이를 coating에 사용하였다. Coating이 끝난 well에 각 항체와 여러 대두단백질의 1:1혼합액을 넣어 경합시켰을 때의 ELISA curve 유형을 비교, 조사하였다.

(1) 항11S, AS항체를 이용한 ciELISA

여러 종류의 대두단백질중에서 항11S, AS항체가 가장 잘 반응하는 대두단백질은 SDS 및 열을 처리한 ISP [ISP(+SDS)], 그리고 2-ME가 함유된 Tris buffer에 용해되는 ISP [ISP(+ME)]이며, 다음으로 2-ME가 존재하지 않는 Tris buffer에 용해되는 ISP [ISP(-ME)] 및 ISP, 그 다음으로는 crude 11S였다 (Fig. 2-4). 이들 각 단백질에 대한 반응성을 IC₅₀ 값으로 나타내면, 각각 2, 2.5, 20, 20, 그리고 200 ug/ml이었다. 한편, 항11S, AS

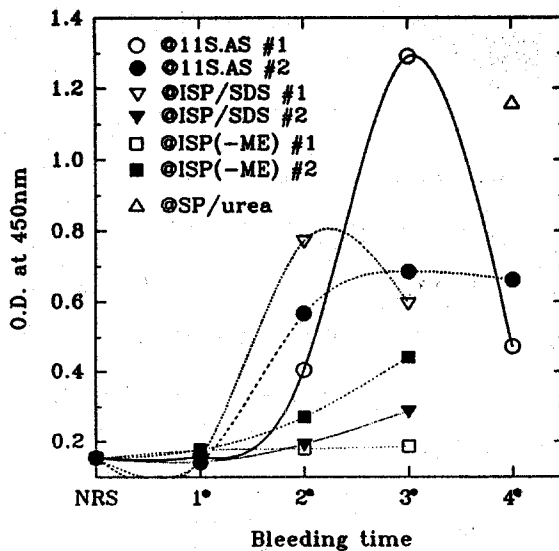


Fig. 2-3. Production of anti-soy protein antibodies by six rabbits. Rabbits were immunized with 11S · AS, ISP/SDS, and ISP(-ME). ISP/SDS is SDS and heat treated ISP and ISP(-ME) is soluble fraction of ISP in Tris buffer. Antibody against urea treated soy protein (SP/urea) was used as a positive control.

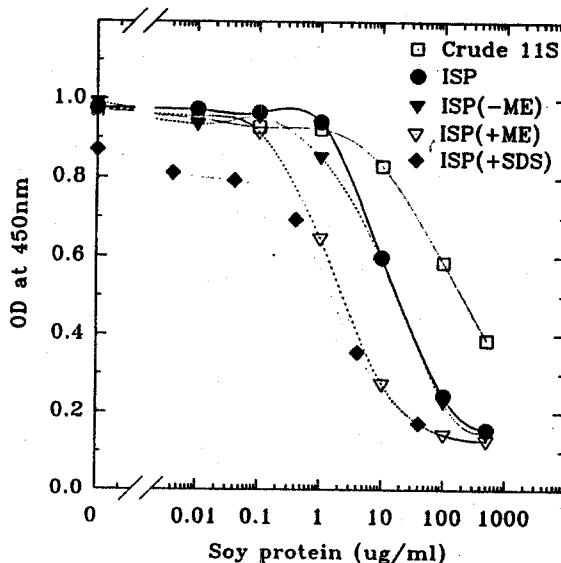


Fig. 2-4. Reactivity of anti-11SAS antibody toward different soy proteins as determined by ciELISA. ISP(+ME) and ISP(-ME) are soluble fractions of ISP in tris buffer with and without 2-ME, respectively. ISP(+SDS) is SDS and heat treated ISP(+ME).

항체는 11S. AS와는 잘 결합하나, 11S. BS와는 거의 반응하지 않음을 확인하였다 (data 생략).

(2) 항ISP/SDS항체를 이용한 ciELISA

항ISP/SDS항체가 가장 잘 반응하는 대두단백질도 위의 경우와 유사한 경향을 나타내었다 (Fig. 2-5). 다만, ISP 및 ISP(-ME)에 대한 반응성이 다소 떨어졌다. 이들 각 단백질 ISP(+SDS), ISP(+ME), ISP(-ME), ISP, 그리고 crude 11S에 대한 반응성을 IC_{50} 값으로 나타내면, 각각 5, 4, 100, 100, 그리고 220 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

(3) 항ISP(-ME)항체를 이용한 ciELISA

항ISP(-ME)항체에 대한 각 단백질들의 반응성은 다소 떨어졌으며, 그중 가장 잘 반응하는 대두단백질은 위의 두 경우와는 달리 면역원으로 사용한 ISP(-ME)였다 (Fig. 2-6). 그외는 대체로 항ISP/SDS항체의 경우와 유사한 경향을 나타내었다. 이들 각 단백질 ISP(+SDS), ISP(+ME), ISP(-ME), ISP, 그리고 crude 11S에 대한 반응성을 IC_{50} 값으로 나타내면, 각각 30, 36, 20, 200, 그리고 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

(4) 항SP/urea항체를 이용한 ciELISA

항SP/urea항체와 대두단백질과의 반응성은 대체로 항11S. AS항체의 경우와 유사한 경향을 나타내었다 (Fig. 2-7). 다만, crude 11S에 대한 반응성이 위의 세 경우와는 달리 매우 높게 나타났다. 이들 각 단백질 ISP(+SDS), ISP(+ME), ISP(-ME), ISP, 그리고 crude 11S에 대한 반응성을 IC_{50} 값으로 나타내면, 각각 2.6, 2, 16, 18, 그리고 20 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

라. cdELISA

(1) 항11S. AS항체-효소 접합체의 준비

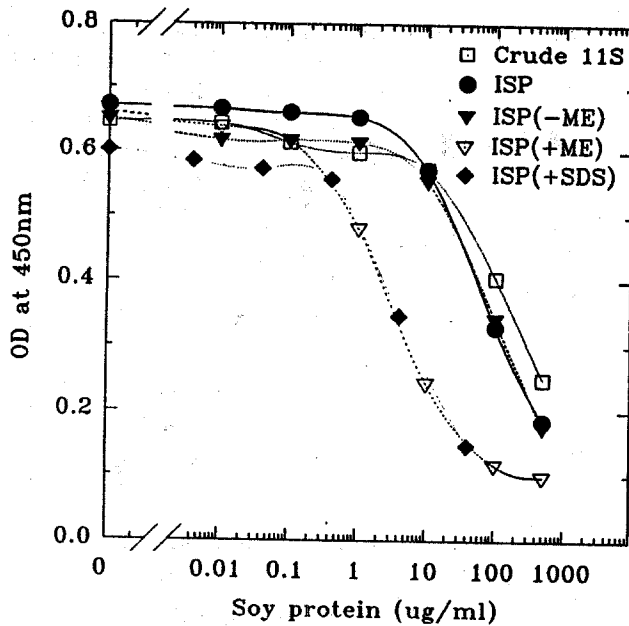


Fig. 2-5. Reactivity of anti-ISP/SDS antibody toward different soy proteins as determined by ciELISA. Soy proteins are same as in Fig 2-5.

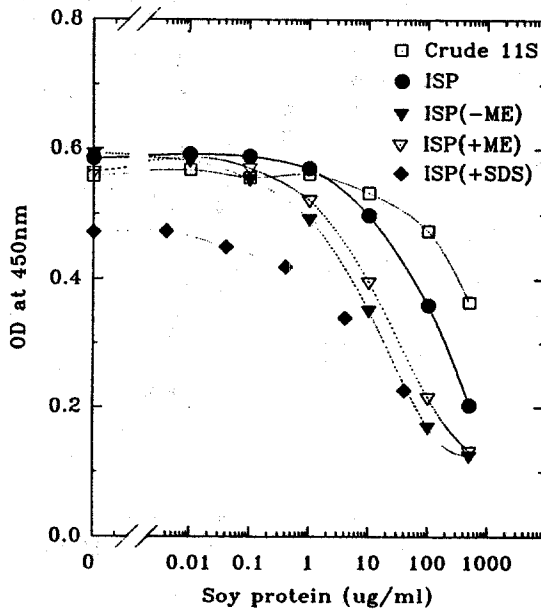


Fig. 2-6. Reactivity of anti-ISP antibody toward different soy proteins as determined by ciELISA. Soy proteins are same as in Fig 2-5.

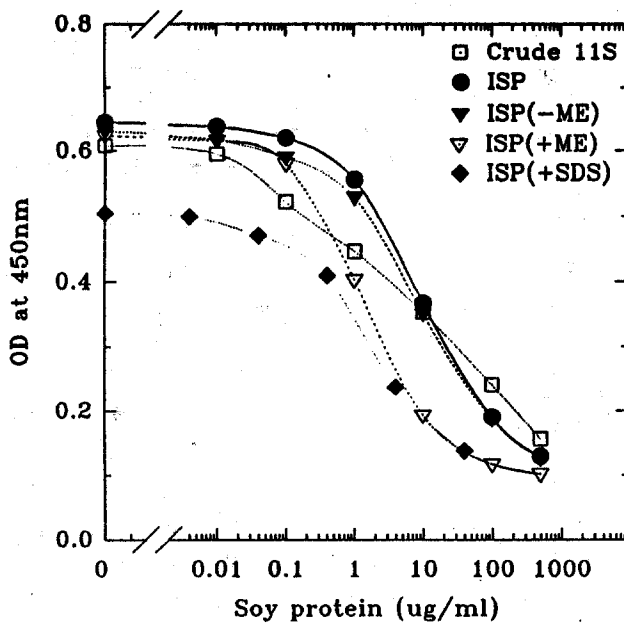


Fig. 2-7. Reactivity of anti-SP/urea antibody toward different soy proteins as determined by ciELISA. Soy proteins are same as in Fig 2-5.

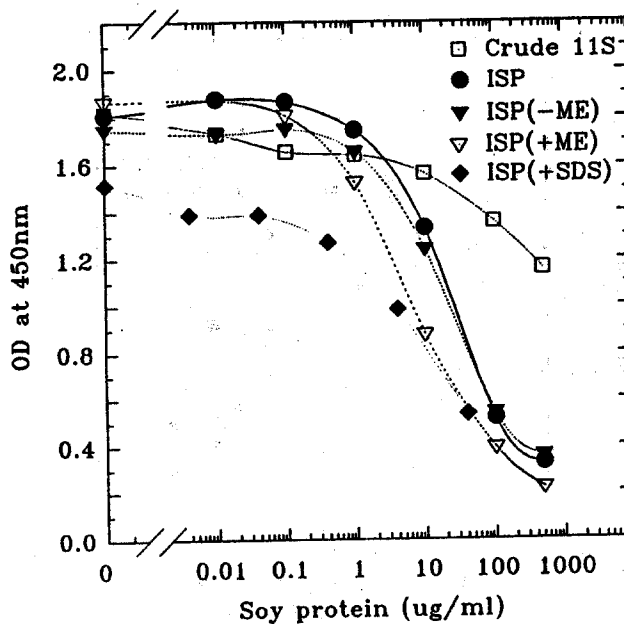


Fig. 2-8. Reactivity of anti-11S · AS-HRP conjugate toward different soy proteins as determined by cdELISA. Soy proteins are same as in Fig 2-5.

위의 ciELISA는 2차항체를 처리하는 과정이 필요한데, 이를 줄일 수 있는 방안으로써, 이 항체에 효소 (HRP)를 부착시킨 것을 사용하는 cdELISA를 시행하는 것이다. 따라서, 위에서 여러 종류의 항체중 가장 유용할 것으로 예상되는 항11S.AS항체를 분리, 정제하고 여기에 실험방법에 명시한 바와 같이 HRP를 부착시켜 anti-11S.AS antibody-HRP conjugate (anti-11S.AS-HRP) 를 준비하였다 (data 생략).

(2) 항11S.AS항체-효소 접합체를 이용한 cdELISA

항11S.AS항체-효소 접합체와 대두단백질과의 반응성은, 항11S.AS 항체의 경우보다 조금 약하나 대체로 유사한 경향을 나타내었으나, crude 11S에 대한 반응성은 위의 모든 경우보다도 매우 낮게 나타났다 (Fig. 2-8). 이는 항11S.AS항체가 HRP와의 conjugation에 의하여 그 반응성 (Fig. 2-4)이 다소 달라진 것으로 생각된다. 각 단백질 ISP(+SDS), ISP(+ME), ISP(-ME), ISP, 그리고 crude 11S에 대한 반응성을 IC₅₀ 값으로 나타내면, 각각 13, 8, 27, 30, 그리고 2,000 ug/ml이었다.

마. 특이항체의 반응성 비교

앞의 다섯 가지 대두단백질에 대한 네 종류 항체의 반응성 (IC₅₀)을 요약하면 Table 2-1과 같다. 대체로 대부분의 항체는 용해성이 높은 ISP(+SDS) 및 ISP(+ME)에 대하여 매우 잘 반응하는 것으로 나타났다. 또한, 항체의 종류에 따라서, 다른 항체가 잘 반응하지 못하는 대두단백질과 높은 반응성을 보인 것도 있다. 예를들면, 항ISP(-ME)항체의 ISP(+ME/-ME)에 대한, 또는 항SP/urea항체의 crude 11S에 대한, 상대적으로 매우 높은 반응성은 주목할 필요가 있다. 따라서, 대두단백질 항원에 대한 항체의 반응성은, 항체의 특이성 (면역시 사용한 대두단백질의 종류) 및 경합에 사용한 단백질 항원의 용해도와 관련이 있는 것으로 생각된다. 이후의 대두단백질 분석에 관한 연구에서는, 본 과제에서 생산한 항체중 대두단백질

Table 2-1. Summary of IC₅₀'s of anti-soy protein antibodies with different soy proteins as determined by ELISA*

Antibody**	soy protein**	crude 11S	ISP	ISP (-ME)	ISP (+ME)	ISP (+SDS)	ELISA
anti-11S AS		200	20	20	2.5	2	ciELISA
anti-ISP/SDS		220	100	100	4	5	
anti-ISP(-ME)		1,000	200	36	20	30	
anti-SP/urea		20	18	16	2	2.6	
anti-11S AS-HRP		2,000	30	27	8	13	cdELISA

* Unit of IC₅₀'s is $\mu\text{g/ml}$.

** Soy proteins and antibodies are referred to the legends of Fig. 2-4 and Fig. 2-5.

과 반응성이 가장 우수한 항11S.AS항체를 사용하였다.

바. 시료중 대두단백질의 분석

(1) 분석조건의 확립

대두단백질의 함량분석을 위하여 최종적으로 채택한 시료처리 방법은 Fig. 2-9와 같다. 즉, "urea, DDT를 이용한 대두단백질의 가용화 --> 가열 (100°C, 1시간) --> renaturation --> 분석"의 처리를 행한 후 회석하여 분석하는 방법이 매우 적합한 것으로 나타났다. 대두단백질 소재로서 ISP가 널리 사용되는 점을 감안하면 ISP를 검출대상 물질로하고 이를 표준물질로 사용하는 것이 바람직하였다. 이 시료처리 조건하에서의 ISP의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 ISP를 PBS에 용해하고 1mg/ml농도에서 60-90°C에서 1분간 열처리하였다 (Fig. 2-10). 그 결과 열처리에 따른 곡선의 변화가 거의 없어 이 시료처리 조건에서 ISP는 가공중 열처리 유무에 크게 영향을 받지 않고 분석이 가능한 것으로 나타났다. ISP분석을 위한 ciELISA의 표준곡선은 Fig. 2-11과 같으며, 대체로 0.3ug/ml이상의 ISP검출이 가능하였다.

(2) ISP첨가 시료의 분석

ISP를 분말상식품 및 소세지에 첨가한 다음 이중에 포함된 ISP의 함량을 앞에서 확립한 방법에 따라 시료를 처리하고 ciELISA로 분석하였다. ISP를 0.5% - 5% 첨가한 탈지분유에서 분석치는 평균 76%, 분산 11.5%로 나타났다 (Table 2-2). 또한 Table 2-3와 같은 조성으로 ISP를 0.5% - 3% 첨가하여 실험실에서 제조한 시험관 소세지의 경우 분석치는 평균 83%, 분산 19%로 나타나 두 경우 모두 비교적 양호한 분석회수율을 보였다 (Table 2-4).

(3) 시판 시료의 분석

Summary Flow Chart:

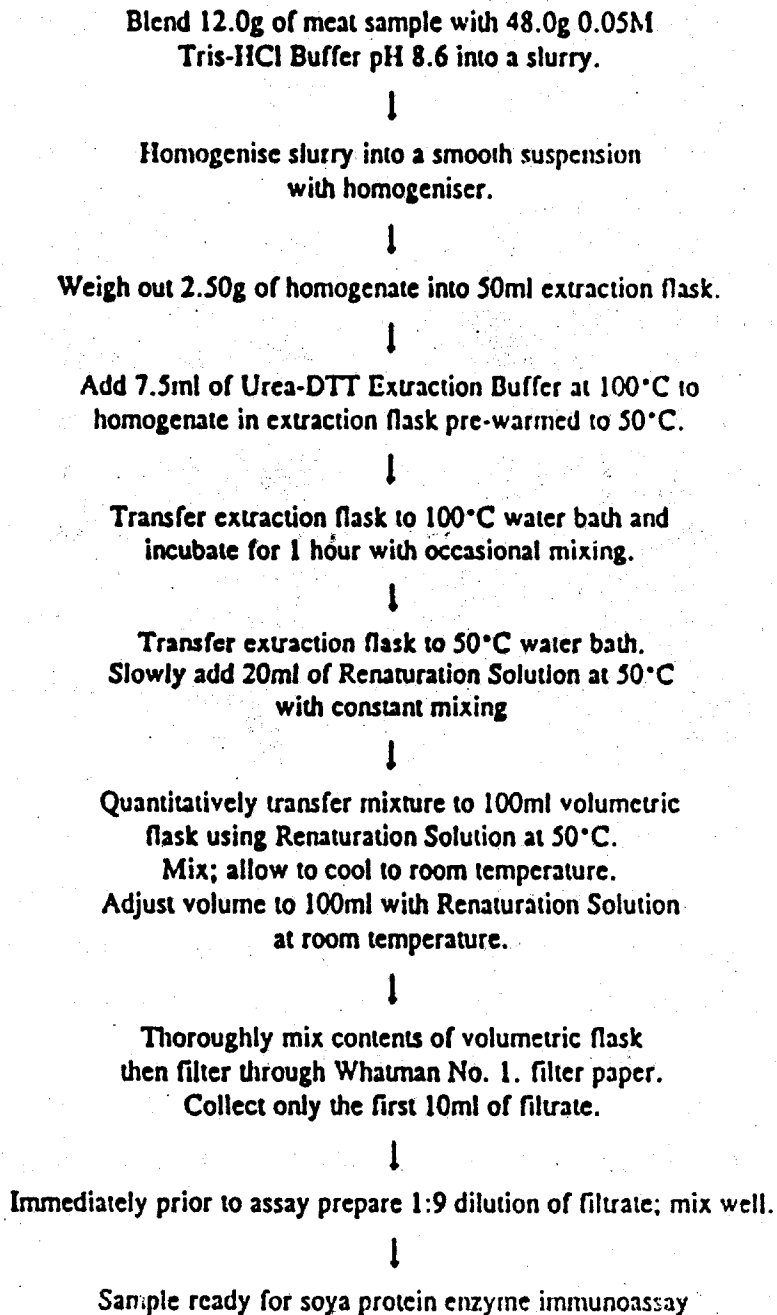


Fig. 2-9. Procedure of sample preparation and extraction for ciELISA of soy protein.

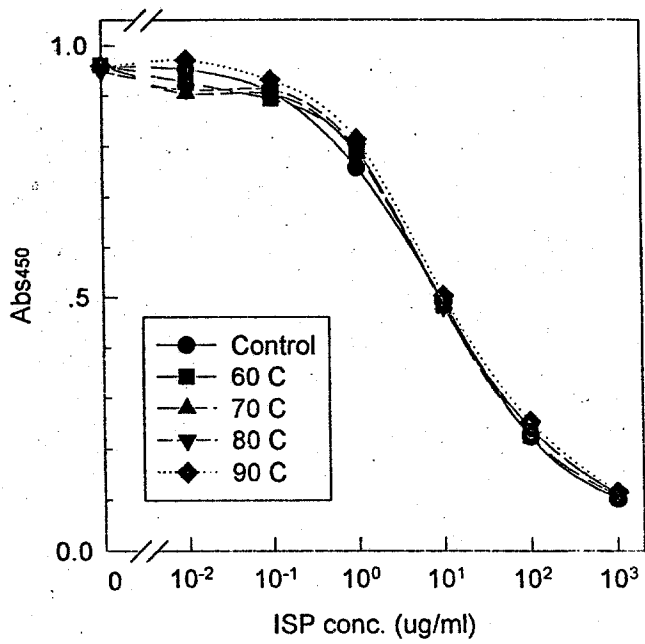


Fig. 2-10. Heat stability of ISP as determined by ciELISA. ISP (1mg/ml in PBS) was heated at each temperature for 10 min.

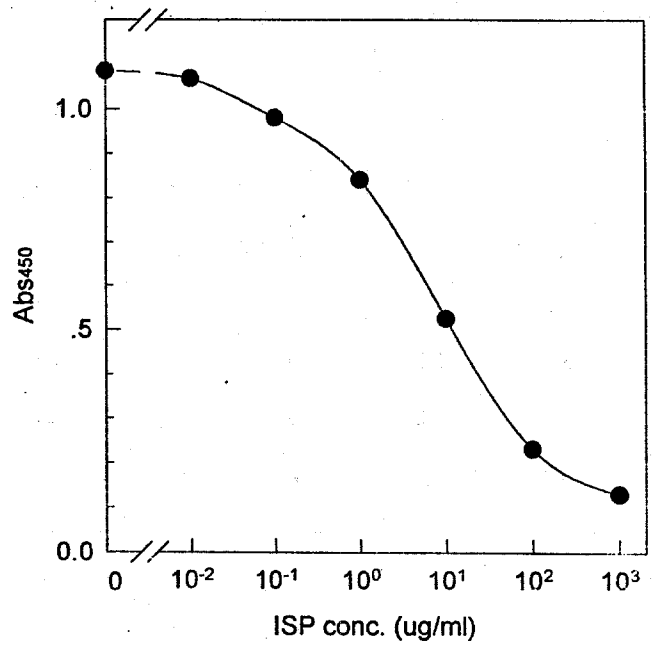


Fig. 2-11. Standard curve of ciELISA for ISP in food samples.

Table 2-2. Recovery of ISP in skim milk as assayed by ciELISA¹

ISP powder added (%)	Dilution ratio	ELISA value	ISP detected (ug/ml)	Corr. factor ²	ISP assayed (%)	Recovery (%)
0	5/10,000	1.59	0	1/5	0	
0.5	"	1.36	2.0	"	0.4	80
1	"	1.31	3.4	"	0.68	68
3	"	1.10	10	"	2.0	67
5	"	0.91	22	"	4.4	88
Overall						76±8.7 (11.5%) ³

¹Powdered ISP was added to a skim milk powder.

²ug/ml --> %

³Mean±S.D. (C.V.)

Table 2-3. Recipe of "test-tube" sausage for spike test of ISP.

Ingredient \ ISP (%)	0	0.5	1.0	2.0	2.5	3.0
Lean meat	70	70	70	70	70	70
NaCl	2	2	2	2	2	2
Ice water	25	25	25	25	25	25
Egg white powder	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5	0
ISP powder	0	0.5	1.0	2.0	2.5	3.0
Total	100	100	100	100	100	100

Table 2-4. Recovery of ISP in lab-made sausage as assayed by ciELISA¹

ISP powder added (%)	Dilution ratio	ELISA value	ISP detected (ug/ml)	Corr. factor ²	ISP assayed (%)	Recovery (%)
0	5/10,000	0.816	0.34	1/5	0.068	
0.5	"	0.706	2.8	"	0.56	112
1.0	"	0.688	3.4	"	0.68	68
2.0	"	0.614	8.0	"	1.6	80
2.5	"	0.507	8.8	"	1.76	70
3.0	"	0.582	12.8	"	2.56	85
Overall						83 ± 16 (19%) ³

¹Powdered ISP was added to a "test-tube" sausage.

²ug/ml --> %

³Mean ± S.D. (C.V.)

Table 2-5. Detection of ISP in commercial food as assayed by ciELISA

Exp lot	Food	Labelled ISP (%)	Dilution ratio	ELISA value	ISP detected (ug/ml)	Corr. factor ¹	ISP assayed (%)	Recovery (%)	Note
1	Sausage-A	None	5/10,000	0.561	5.4	1/5	1.08		목우촌
	Sausage-B	"	"	0.575	4.6	1/5	0.92		김밥햄
	Sausage-C	"	"	0.540	7.2	1/5	1.44		숯불구이햄
	Sausage-D	"	"	0.528	8.0	1/5	1.60		휠터치
	Sausage-E	"	"	0.562	5.4	1/5	1.08		순돈육시대
	Sausage-F	1.73	"	0.531	7.6	1/5	1.52	88	비엔나
	Average	1.27 ± 0.26							
2	Milk subst. powder	None	5/100,000	0.679	7.0	10/5	14.0		(자돈용)

ug/ml --> %

시판 소세지류 및 대용유중에 함유된 ISP의 함량을 ciELISA로 분석하였다. 소세지 6점에서 평균 1.27%의 ISP가 함유된 것으로 나타났으며 자돈용 분말상 대용유 1점에서 14%의 ISP가 함유된 것으로 나타났다 (Table 2-5).

따라서, 본 연구에서 개발한 식품중 대두단백질 분석방법은 실영화가 가능한 양호한 방법으로 판명되었으며, 검출키트의 개발에도 적극활용할 필요가 있다.

2. 우유 단백질의 ELISA 개발

가. 우유단백질 α 1-casein의 분리

우유단백질중 가장 많은 성분인 α 1-casein을 1차적인 검출대상으로 하여 이를 분리하였다. 즉, crude α s-casein을 urea의 존재하에서 NaCl 농도구배 0-0.4M로 처리한 DEAE-sephadex A-50 anion exchange chromatography를 행하였으며, α 1-casein의 분리 패턴은 Fig. 2-12와 같았다. 성분을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 행하고 은염색한 결과 가장 큰 peak가 α 1-casein임을 확인할 수 있었다(data 생략). 따라서, 이를 다음 실험에 사용하였다.

나. 항체의 생산

α 1-casein을 면역원으로 하여 생산한 항혈청의 항체 역가를 조사하기 위하여 일정배율로 희석한 항혈청으로 비경합 ELISA를 행한 결과, Fig. 2-13과 같이 2번 토끼에서 3차 면역이후에 높은 항체가를 보였다.

다. 간접경합 ELISA (ciELISA)

α 1-casein의 정량을 위한 ciELISA의 조건을 확립하였다. α

s1-casein의 농도에 따른 ciELISA의 표준곡선을 작성한 결과, Fig. 2-14에 나타난 바와 같이 2번 토끼 3차 항혈청 및 4차 항혈청에 의한 양호한 경합반응을 나타내었으며 0.1ug/ml이상의 농도가 정량가능함을 알 수있었다. 이후의 실험에서는 4차 항혈청을 이용하였다.

라. 교차반응

α s1-casein이외의 유단백질에 대한 특이항체의 반응성을 조사하였다. Fig. 2-15에 나타난 바와 같이 탈지유에 대하여는 높은 반응성을 보였으며, β -casein과 WPI에 대하여는 1/1,000가량의 낮은 반응성을 보임으로써 α s1-casein에 대한 특이성이 매우 우수한 항체가 생산되었음을 알 수있었다. 그러나 그외의 단백질인 BSA, α -lactoglobulin, β -lactoglobulin, 분리대두단백(ISP)에 대하여는 반응하지 않았다.

마. Sandwich ELISA

항체를 protein A column을 이용하여 정제하는 한편, 이를 효소(oxidase)와 결합시켜 sandwich ELISA 분석법을 개발하였다. 그 표준곡선은 Fig. 2-16에 나타난 바와 같이 검출한계가 0.1ug/ml로서 ciELISA의 경우보다 10배가량 감도가 양호함을 알 수 있다.

바. 액상유제품 시료의 ELISA분석

액상유제품 시료에 대하여 α s1-casein을 분석한 결과, 시유에서 3.3%가량으로 나타나 기대치 (1.3%)보다 높게 나타났으며, 농후요구르트에서도 이와 유사한 경향을 보였고, 액상의 야쿠르트에서는 0.5%로 나타났다 (Table 2-6).

사. 분말상 시료의 ELISA분석

분말상 시료에 대하여 분석한 결과, 탈지분유에서 약 34%로 나타나

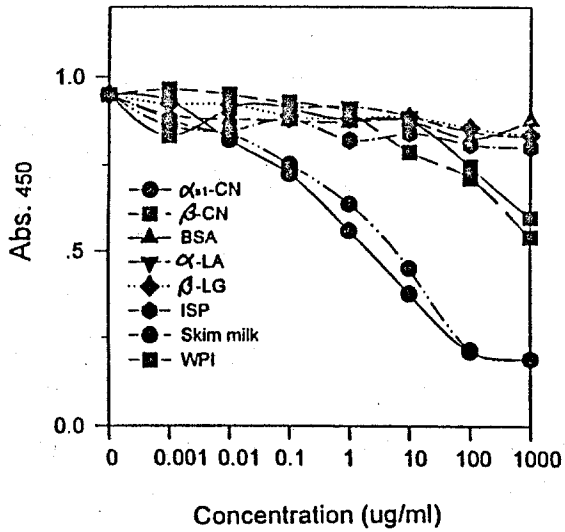


Fig. 2-15. Cross-reactivity of polyclonal antibody against α_1 -casein toward analogues as determined by ciELISA.

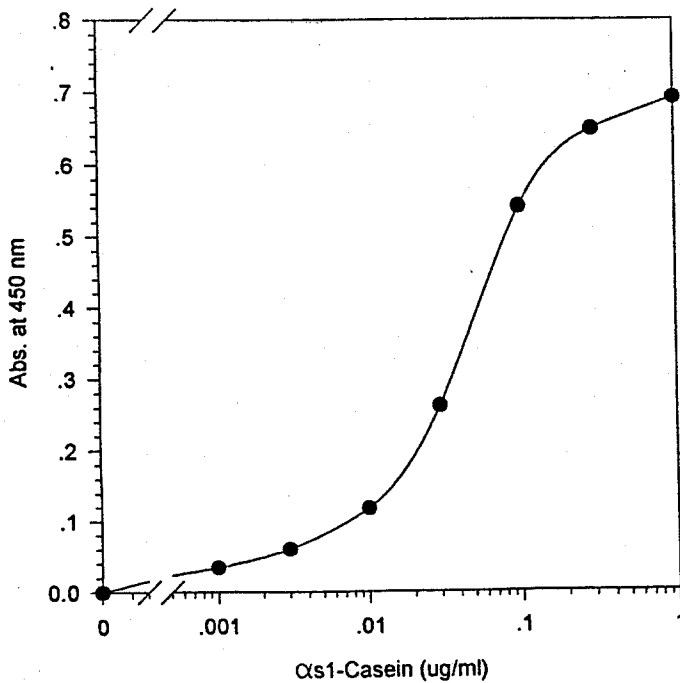


Fig. 2-16. Standard curve for α_1 -casein as determined by sandwich ELISA.

Table 2-6. ELISA에 의한 액상 유제품종의 α 1-카제인 분석결과

Sample	Dilution ratio	ELISA value			α 1-casein (ug/ml)	corr. factor	α 1-casein (%)
		1	2	mean			
시유	1/500k	0.672	0.680	0.676	0.07	50	3.5
	1/1,000k	0.469	0.494	0.482	0.03	100	3
농후요구르트	1/500k	0.707	0.670	0.689	0.075	50	3.75
	1/1,000k	-	0.492	0.492	0.032	100	3.20
야쿠르트	1/100k	0.615	0.586	0.601	0.05	10	0.5

Table 2-7. ELISA에 의한 분말 식품소재종의 α 1-카제인 분석결과

Sample	Dilution ratio	ELISA value			α 1-casein (ug/ml)	corr. factor	α 1-casein (%)
		1	2	mean			
WPI	1/10k	0.313	0.333	0.323	0.028	1	0.028
ISP	1/10k	0.479	0.493	0.486	0.078	1	0.078
대용유	1/10k	0.512	0.518	0.515	0.09	1	0.09
Skimmilk	1/1,000k	0.653	0.641	0.647	0.23	100	23
	1/10,000k	0.406	0.375	0.391	0.044	1000	44

Table 2-8. 시유에 첨가한 α 1-카제인의 ELISA분석 회수율

α 1-casein (added)	ELISA value (A_{450})				α 1-casein (ug/ml)	Corr. factor	Ⓐ α 1-casein (assayed)	Ⓑ α 1-casein (expected)	Recovery (Ⓐ/Ⓑ) x100, (%)
	1	2	3	mean					
-	-	0.362	0.354	0.358	0.035	100	3.5%	-	-
1%	0.147	0.444	0.459	0.450	0.062	100	6.2%	4.5%	138
3%	0.433	0.429	0.453	0.438	0.055	100	5.5%	6.5%	85
5%	0.487	0.472	0.526	0.495	0.080	100	8.0%	8.5%	94
10%	0.586	0.558	0.589	0.578	0.140	100	14%	13.5%	104
Average \pm S.D.									104 \pm 21

이 경우에도 기대치 15%보다 높게 나타났다 (Table 2-7). ISP, WPI, 대용유에서는 각각 0.08, 0.03, 0.09%로 나타났다. 따라서, 일부 중요 유제품 시료에서 α s1-casein의 ELISA분석치가 2 - 3 배 높게 나타나는 불일치는 표준단백질과 시료 단백질의 용해도 차이에서 기인하는 바가 큰 것으로 생각되며 이를 개선할 필요가 있다.

아. Spike test

희석한 우유 시료에 α s1-casein용액을 첨가하고 ELISA를 행한 결과, 첨가한 부분에 대한 분석회수율은 1 - 10%농도 범위내에서 평균 104%로 나타나 양호하였다 (Table 2-8).

자. 다른 유단백질에 대한 항체의 생산

α s1-casein이외에 α -lactoglobulin, β -lactoglobulin에 대한 특이 항체를 생산하고 ciELISA의 표준곡선을 비교하였을 때, 생산된 이들 단백질에 대한 항체의 특이성은 항 α s1-casein 항체의 경우보다 특이성이 떨어지는 것으로 나타났다 (Fig. 2-17). 이들 항체는 열안정성이 떨어지는 두 단백질의 정량분석에는 사용하기 힘들으나 정성분석에 활용가능하다.

3. 계란 단백질의 ELISA 개발

가. Ovalbumin의 검출법 개발

(1) 항ovalbumin 항체의 생산

계란단백질중 가장 높은 비율을 차지하고 구성단백질인 ovalbumin (OA)을 면역원으로 하여 앞의 방법과 같이 토끼에 수차례 면역하고 채혈하여 항혈청을 분리하였다. 면역횟수에 따라 생산된 항체의 역가를 조사하기 위하여 일정배율로 희석한 항혈청으로 비경합ELISA를 행한 결과, Fig.

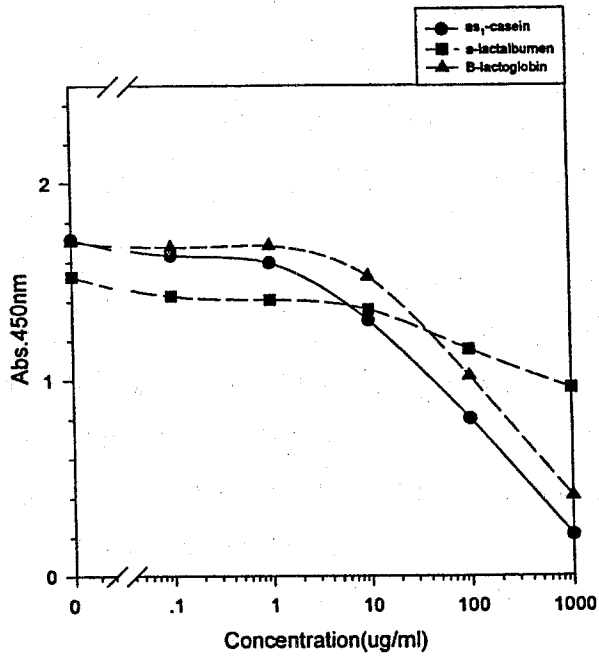


Fig. 2-17. Standard curve for milk proteins as determined by cELISA. Each immunized protein was coated onto microplate wells.

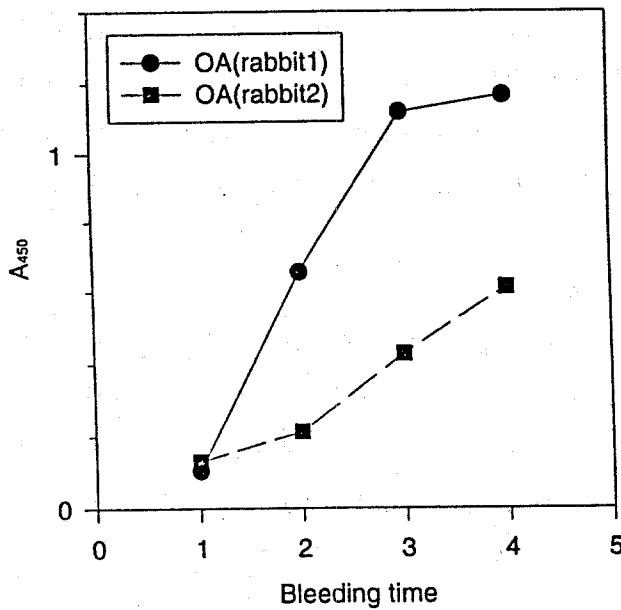


Fig. 2-18. Production of anti-OA antibody by rabbits.

2-18과 같이 1번 토끼에서 3차 면역이후에 높은 항체가를 보였다. 따라서, 4차 채혈한 이 항혈청을 protein A column으로 정제하고, 그중 일부를 horseradish peroxidase (HRP) 효소와 결합하여 항OA 항체-HRP conjugate를 만들어 다음 실험에 사용하였다.

(2) 샌드위치 ELISA (sandwich ELISA)

OA의 정량을 위하여 sandwich ELISA의 조건을 확립하였다. 즉, 앞에서 정제한 항OA 항체를 $2\mu\text{g/ml}$ 농도로 coating한 well에 OA용액을 처리한 다음, 항OA항체-HRP conjugate를 처리하였다. 기질용액(TMB)을 첨가하여 효소반응시키고 450nm에서 발색의 정도를 측정하였다. OA의 농도에 따른 ciELISA의 표준곡선을 작성한 결과, Fig. 2-19에 나타난 바와 같이 검출한계는 $0.001\mu\text{g/ml}$ 이었다.

(3) 간접경합 ELISA (ciELISA)

OA의 정량을 위한 ciELISA의 조건을 확립하였다. 즉, 면역원인 OA를 $2\mu\text{g/ml}$ 농도로 coating한 well에 항혈청과 시료단백질 용액을 1:1로 혼합하여 넣고서 경합반응을 시킨 다음 goat anti-rabbit Ig antibody-HRP를 반응시킨 후, 기질용액(TMB)을 첨가하여 효소반응시킨 다음, 450nm에서 발색의 정도를 측정하였다. OA의 농도에 따른 ciELISA의 표준곡선을 작성한 결과, Fig. 2-20에 나타난 바와 같이 검출감도는 $1\mu\text{g/ml}$ 이었다.

(4) 항OA 항체의 교차반응

OA이외의 단백질에 대한 특이항체의 반응성을 조사하였다. Fig. 2-19의 sandwich ELISA로 조사한 교차반응에서 항OA 항체는 ovomucoid에 무시가능한 반응성을 보였으나 그외의 단백질인 BSA, casein, WPI 및 ISP에 대한 반응성은 전혀 없었다 (Table 2-9). 따라서, OA에 대한 특이성이 극히 우수한 항체가 생산되었음을 알 수있었다.

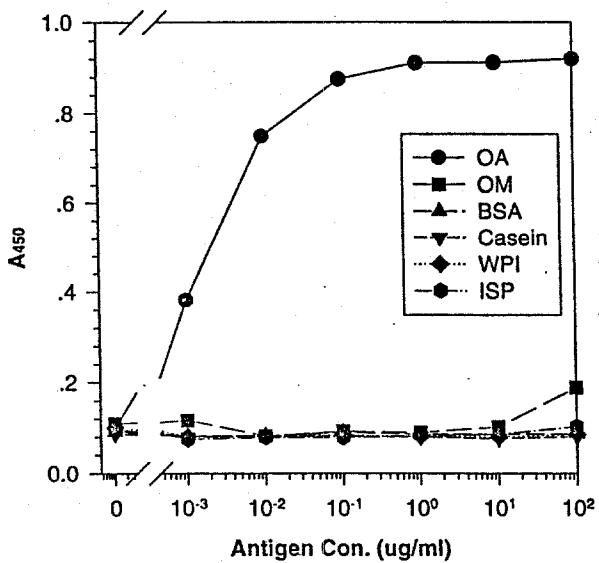


Fig. 2-19. Standard curve of sandwich ELISA for OA and reactivity of anti-OA antibody toward protein antigens.

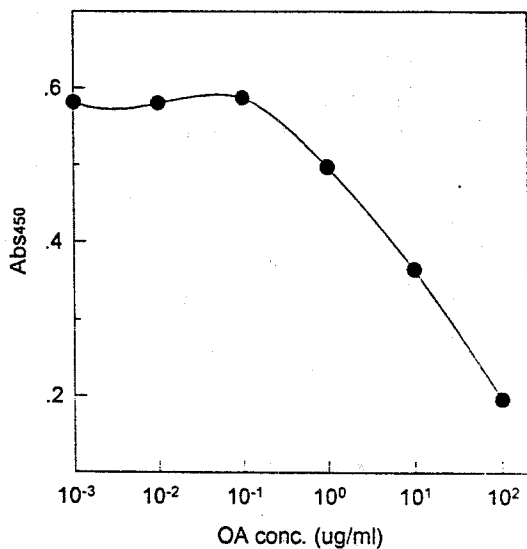


Fig. 2-20. Standard curve of ciELISA for OA.

Table 2-9. Cross-reactivity of specific antibody toward protein antigens

Antibody	Antigen	sandwich ELISA		ciELISA	
		RC ₅₀ (ug/ml)	Reactivity (%)	IC ₅₀ (ug/ml)	Reactivity (%)
anti-OA	OA	0.002	100		
	OM	(2,000)	0.0001		
	Casein	N.D. ¹	0		
	BSA	N.D.	0		
	WPI	N.D.	0		
	ISP	N.D.	0		
anti-OM	OM	0.079	100	0.2	100
	OA	250	0.032	50	0.4
	Casein	N.D.	0	500	0.04
	BSA	N.D.	0	N.D.	0
	WPI	N.D.	0	N.D.	0
	ISP	N.D.	0	N.D.	0

¹N.D., not detectable.

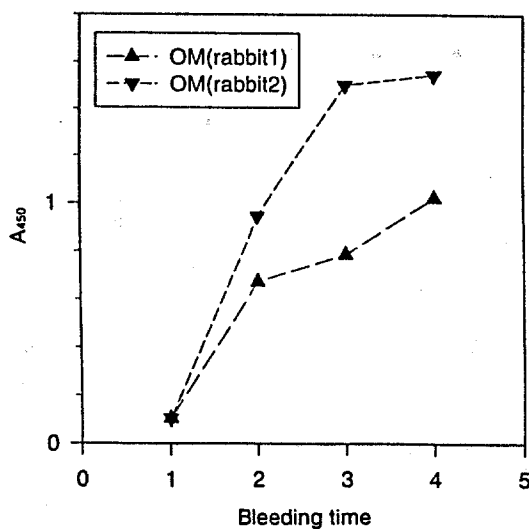


Fig. 2-21. Production of anti-OM antibody by rabbits.

나. Ovomuroid의 검출법 개발

(1) 항ovomuroid 항체의 생산

OA이외에 중요 계란단백질인 ovomucoid (OM)에 대한 특이항체를 생산하기 위하여 이를 앞의 방법과 같이 토끼에 수차례에 걸쳐 면역하고 채혈하여 항혈청을 분리하였다. 면역횟수에 따라 생산된 항체의 역가를 조사하기 위하여 일정배율로 희석한 항혈청으로 비경합 ELISA를 행한 결과, Fig. 2-21과 같이 2번 토끼에서 3차 면역이후에 높은 항체가를 보여 이후의 실험에서는 4차 채혈한 혈청을 사용하였다.

(2) 샌드위치 ELISA (sandwich ELISA)

항OM 항체를 정제하고 항체-효소(HRP) conjugate를 준비하여 sandwich ELISA를 실시하였다. 이 경우는 OA의 경우보다는 다소 검출감도가 낮지만 매우 낮은 농도 (0.003ug/ml)이상의 정량이 가능하였다 (Fig. 2-22).

(3) 간접경합 ELISA (ciELISA)

OM의 정량을 위한 ciELISA의 조건을 확립하였을 때, Fig. 2-23에 나타난 표준곡선으로부터 그 검출한계는 0.3ug/ml임을 알 수있었다.

(4) 항OM 항체의 교차반응

OM이외의 다른 단백질에 대한 특이항체의 반응성을 조사하였다. Fig. 2-22의 sandwich ELISA로 조사한 경우 OA에 대하여 0.032%의 미약한 교차반응을 나타냈다 (Table 2-9). Fig. 2-23의 ciELISA에서는 이보다 큰 교차반응을 나타내어 OA에 대하여 0.4%, casein에 대하여 0.04%의 반응성을 보였다. 그러나 BSA, WPI 및 ISP에 대한 반응성은 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서, 생산된 특이항체는 OM에 대한 특이성이 매우 높음을 알

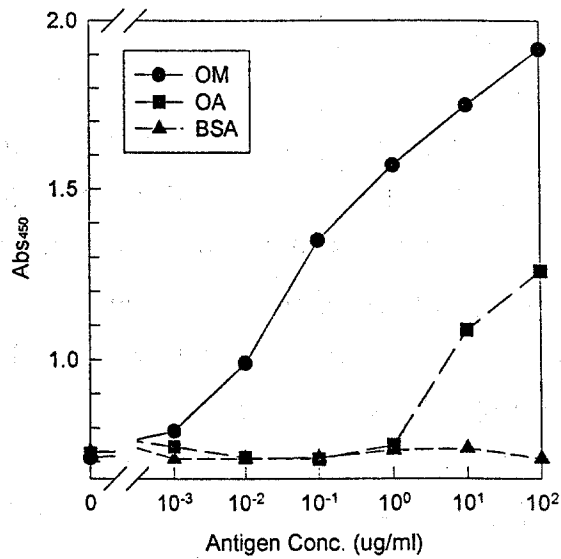


Fig. 2-22. Standard curve of sandwich ELISA for OM and reactivity of anti-OM antibody toward protein antigens.

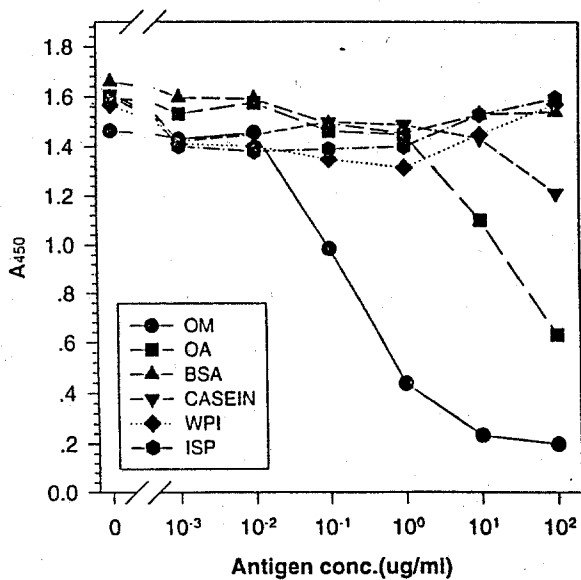


Fig. 2-23. Standard curve of ciELISA for OM and reactivity of anti-OM antibody toward protein antigens.

수 있었다.

다. 계란단백질의 열안정성

(1) OA의 열안정성

PBS에 1mg/ml의 농도로 용해한 OA를 60 - 90°C에서 10분간 처리하고 OA의 열안정성을 ELISA로 조사하였다. 그 결과 특이하게도 OA는 열처리 특이항체와의 반응성이 대조구에 비하여 높게 나타났다. 우선 sandwich ELISA로 조사한 경우 그 결과 Fig. 2-24에 나타난 바와 같이 최고 1,500배 가량 높은 반응성을 보였으며, Fig. 2-25의 ciELISA로 조사한 경우에도 최고 300배 가량의 반응성을 보였다 (Table 2-10).

(2) OM의 열안정성

OA의 경우와 마찬가지로 방법으로 OM의 열안정성을 조사한 결과, OM은 열에 매우 안정한 단백질임을 알 수 있었다. 즉, Fig. 2-26의 sandwich ELISA로 조사한 경우 열처리에 따라 반응성이 0.12배까지 낮아졌으며, Fig. 2-27의 ciELISA로 조사한 경우에는 최저 0.62배까지 낮아졌다 (Table 2-10). 그러나, 이 결과는 일반적인 단백질에 비하여 OM의 열안정성이 매우 높음을 나타내고 있다.

라. 시료중 계란단백질의 분석

(1) 분석조건의 확립

항OM 항체를 이용한 ciELISA를 시료중의 계란단백질 분석법으로 채택하였다. 즉, 앞에서 OM은 계란단백질의 함량분석에 적합한 검출대상 단백질이었으며, ciELISA가 sandwich ELISA의 경우보다 OM의 열안정성이 외관상 높게 나타나 열처리를 받는 가공식품중의 OM의 분석에 유용하기 때문이었다. 시료처리는 homogenizer로 균질화하고 이를 희석한 용액을 ciELISA에 사용하였다.

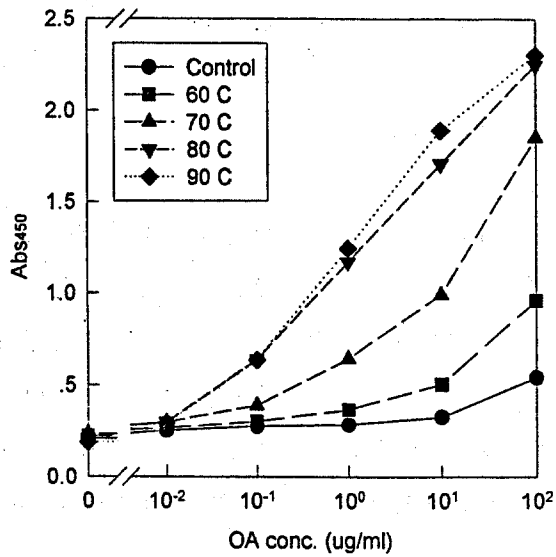


Fig. 2-24. Heat stability of OA as determined by sandwich ELISA. OA (1mg/ml in PBS) was heated at each temperature for 10 min.

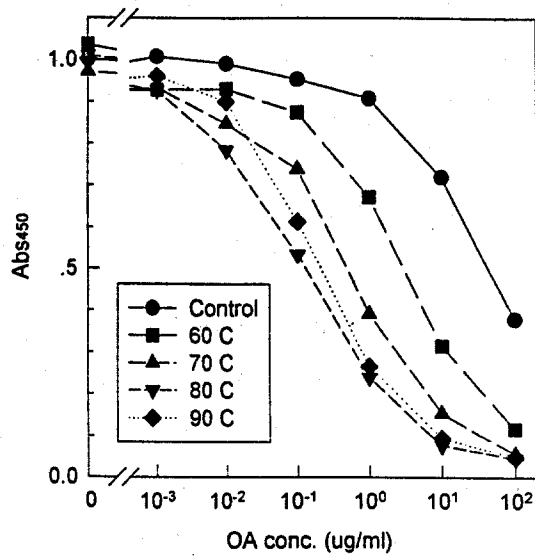


Fig. 2-25. Heat stability of OA as determined by ciELISA. OA (1mg/ml in PBS) was heated at each temperature for 10 min.

Table 2-10. Reactivity of specific antibody toward heat-treated egg proteins

Egg Protein	Heat ¹	sandwich ELISA		ciELISA	
		RC ₅₀ (ug/ml)	Reactivity	IC ₅₀ (ug/ml)	Reactivity
OA	Control	1554	1.0	30	1.0
	60°C	271.2	5.7	2.1	14.3
	70°C	22.39	69.4	0.38	79.0
	80°C	1.36	1143	0.09	333
	90°C	1.00	1554	0.18	167
OM	Control	0.023	1.0	2.0	1.0
	60°C	0.040	0.58	1.8	1.06
	70°C	0.058	0.40	1.9	1.03
	80°C	0.10	0.23	2.1	0.79
	90°C	0.19	0.12	3.0	0.62

¹Protein solution (1mg/ml in PBS) was heated at each temperature for 10 min.

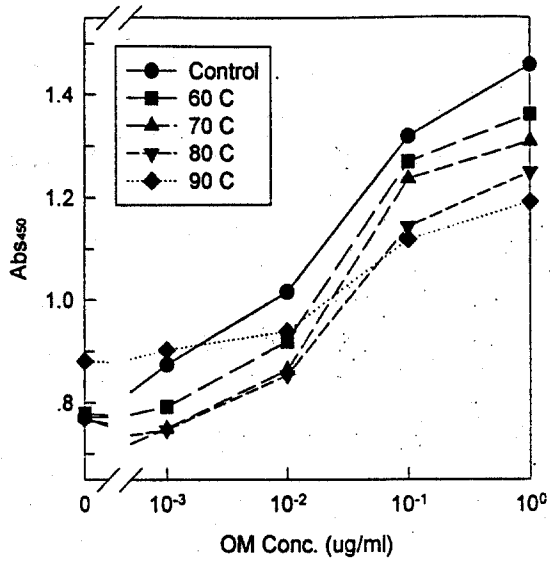


Fig. 2-26. Heat stability of OM as determined by sandwich ELISA. OM (1mg/ml in PBS) was heated at each temperature for 10 min.

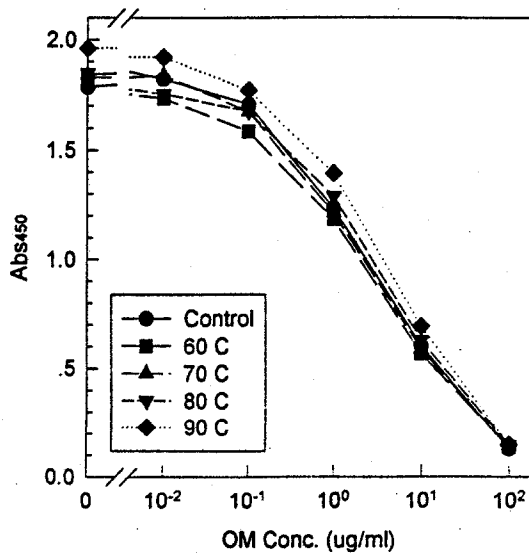


Fig. 2-27. Heat stability of OM as determined by ciELISA. OM (1mg/ml in PBS) was heated at each temperature for 10 min.

(2) 식품소재의 ciELISA 반응성

흔히 사용되는 식품소재인 전란분말, 탈지분유, 자돈용 대용유, 이유식, 생난백, 난백분말에 대한 항OM 항체의 반응성을 ciELISA로 조사하였다 (Fig. 2-28, Fig. 2-29). OM에 대한 반응성을 100%로 하였을 때, 이들의 교차반응율은 각각 4.0, <0.15, <0.01, 0, 12.3, 1.22%로 나타났다. 기존문헌치를 참고하여 구한 전란분말, 생난백, 난백분말중 OM의 함량은 각각 2.7, 11, 1.22%임을 감안하면, 이들에 대한 ciELISA의 교차반응율은 다소 높은 경향을 보였다 (Table 2-11). 이후의 시료중 OM분석시는 이들 소재에 대한 항OM 항체의 반응성을 기준으로 하여 ciELISA에 의한 OM의 함량을 분석하였다.

(3) 전란분말을 첨가한 분말상 시료의 분석

전란분말을 대용유 및 이유식에 1 - 10% 첨가하고 이 들중의 OM함량을 ciELISA로 분석한 결과는 Table 2-12, Table 2-13과 같다. 즉, 전자의 경우 평균 129%, 분산 10.7%이었으며, 후자의 경우는 평균 244%, 분산 28.7%로 분석의 회수율이 다소 높게 나타났다.

(4) 생난백을 첨가한 소세지의 분석

계란성분이 들어있지 않은 시판소세지를 균질화하고 여기에 생난백을 1 - 10% 첨가한 다음 ciELISA로 분석하였다. 그 결과 OM의 회수율은 평균 74%, 분산 16.9%로 나타났다 (Table 2-14).

(5) 난백분말을 첨가한 시험관 소세지의 분석

Fig. 2-15와 같은 조성으로 난백분말을 0.5% - 3% 첨가하여 실험실에서 제조한 시험관 소세지의 경우 분석치는 평균 74%, 분산 17%로 나타났다 (Table 2-16).

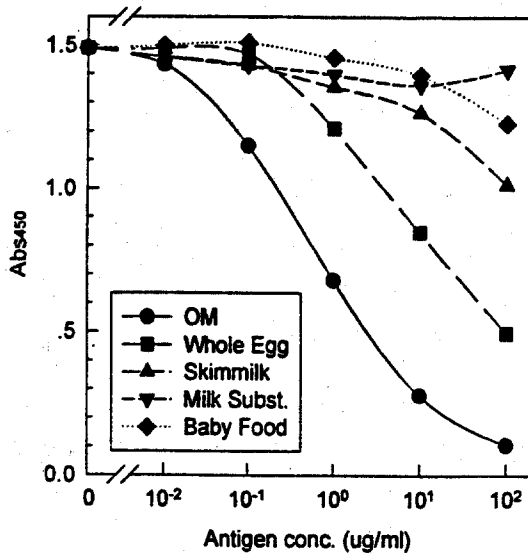


Fig. 2-28. Reactivity of anti-OM antibody toward powdered food.

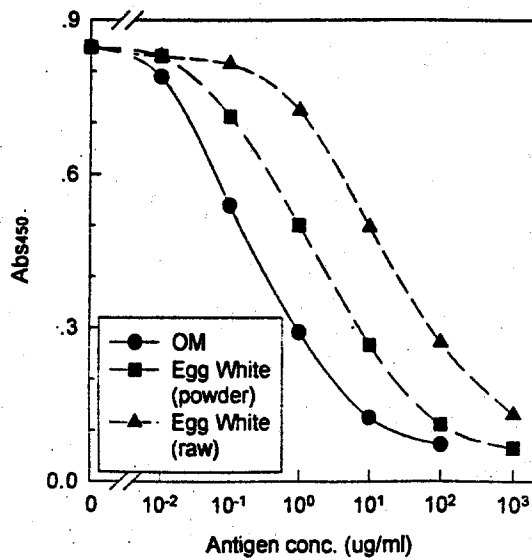


Fig 2-29. Reactivity of anti-OM antibody toward egg white.

Table 2-11. Cross-reactivity of anti-OM antibody toward some food materials

Antigen	IC ₅₀ (ug/ml)		Reactivity (%)	Remark ²
	Exp. 1	Exp. 2		
OM	0.72	0.27	100	
Whole egg (powder)	18		4.0	2.7%
Skim milk (Powder)	(>486)		<0.15	
Milk subst. (powder)	(>7,200)		<0.01	
Baby food (powder)	N.D. ¹		0	
Egg white (powder)		2.2	12.3	11%
Egg white (raw)		19	1.42	1.22%

¹N.D., not detectable.

²Estimation of relative concentration based on references.

Table 2-12. Recovery of OM in milk substitute as assayed by ciELISA¹

Egg powder added (%)	Dilution ratio	ELISA value	OM detected (ug/ml)	Corr. factor ²	OM assayed (%)	OM expected ³ (%)	Recovery (%)
1	1/10,000	0.618	0.0548	1	0.0548	0.04	137
3	"	0.505	0.174	1	0.174	0.12	145
5	"	0.476	0.245	1	0.245	0.20	123
10	"	0.424	0.437	1	0.437	0.40	109
Overall							129 ± 13.7 (10.7%) ⁴

¹Powdered whole egg was added to a milk substitute powder.

²ug/ml --> %

³Based on that the OM concentration in egg powder was determined 4% by ciELISA.

⁴Mean ± S.D. (C.V.)

Table 2-13. Recovery of OM in baby food as assayed by ciELISA¹

Egg powder added (%)	Dilution ratio	ELISA value	OM detected (ug/ml)	Corr. factor ²	OM assayed (%)	OM expected ³ (%)	Recovery (%)
0	1/10,000	0.881	0.0065	1	0.0065	0	
1	"	0.631	0.141	1	0.141	0.04	353
3	"	0.562	0.282	1	0.282	0.12	235
5	"	0.505	0.460	1	0.460	0.20	230
10	"	0.470	0.628	1	0.628	0.40	157
Overall	244 ± 70.2 (28.7%) ⁴						

¹Powdered whole egg was added to a weaning diet powder.

²ug/ml --> %

³Based on that the OM concentration in egg powder was determined 4% by ciELISA.

⁴Mean ± S.D. (C.V.)

Table 2-14. Recovery of OM in commercial sausage as assayed by ciELISA¹

Egg white raw added (%)	Dilution ratio	ELISA value	OM detected (ug/ml)	Corr. factor ²	OM assayed (%)	OM expected ³ (%)	Recovery (%)
0	5/10,000	1.172	0.014	1/5	0.0028	0	
1	"	0.921	0.0628	1/5	0.0126	0.0142	88.7
3	"	0.814	0.123	1/5	0.0246	0.0426	57.7
5	"	0.714	0.235	1/5	0.047	0.071	66.2
10	"	0.640	0.589	1/5	0.118	0.142	83.1
Overall	73.9 ± 12.5 (16.9%) ⁴						

¹Raw egg white was added to a egg-free commercial sausage.

²ug/ml --> %

³Based on that the OM concentration in raw egg white was determined 1.42% by ciELISA.

⁴Mean ± S.D. (C.V.)

Table 2-15. Recipe of "test-tube" sausage for spike test of powdered egg white.

Egg white pwd (%) Ingredient	0	0.5	1.0	2.0	2.5	3.0
Lean meat	70	70	70	70	70	70
NaCl	2	2	2	2	2	2
Ice water	25	25	25	25	25	25
ISP powder	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5	0
Egg white powder	0	0.5	1.0	2.0	2.5	3.0
Total	100	100	100	100	100	100

Table 2-16 . Recovery of OM in lab-made sausage¹

Egg white powder added (%)	Dilution ratio	ELISA value	OM detected (ug/ml)	Corr. factor ²	OM assayed (%)	OM expected ³ (%)	Recovery (%)
0	5/10,000	0.657	0	1/5	0	0	-
0.5	"	0.386	0.22	1/5	0.044	0.062	71.0
1	"	0.372	0.26	1/5	0.052	0.123	42.3
2	"	0.274	0.95	1/5	0.190	0.246	62.6
3	"	0.249	1.32	1/5	0.264	0.370	71.4
Overall							65.5 ± 13.6 (20.8%) ⁴

¹Powdered egg white was added to a "test-tube" sausage.

²Same as in Table 3.

³Based on that the OM concentration in egg white powder was determined 12.3% by ciELISA.

Table 2-17. Detection of OM in commercial food as assayed by ciELISA

Food	Labelled egg white raw (%)	Dilution ratio	ELISA value	OM detected (ug/ml)	Corr. factor ¹	OM assayed (%)	OM expected ² (%)	Recovery (%)
Crab meat analog	2.64	5/10,000	1.103	0.2	1/5	0.04	0.037	108
Sausage-A	5.58	"	0.946	0.5	1/5	0.1	0.079	127
Sausage-B	0	"	1.366	0.016	1/5	0.0032	0	
Overall								118

¹ug/ml --> %

²Based on that the OM concentration in raw egg white was determined 1.42% by ciELISA.

전체적으로 계란성분을 첨가한 시료중 OM의 분석회수율은 위의 네 경우 모두 비교적 양호하였다.

(6) 시판 시료의 분석

시판 시료중에 함유된 OM의 함량을 ciELISA로 분석하였다. 소세지 1점에서 OM의 함량은 0.04%, 소세지 2점에서 0.1% 및 0.0032%로 나타났다 (Table 2-17). 이는 제품에 표시된 생난백의 함량을 기준으로 환산한 OM의 분석기대치 0.037%, 0.079% 및 0%와 비교시 만족스러운 분석결과를 보였다.

따라서, 본 연구에서 개발한 ciELISA는 식품시료중 계란성분 분석법으로 실용화가 가능한 양호한 방법으로 판명되었으며, 검출키트의 개발에도 적극활용할 필요가 있다.

제 4 절 참고문헌

김천제, 김종배, 김병철, 이승배, 정성원, 신현길, 고원식. 1992. 육제품에 첨가된 대두단백 정량을 위한 면역분석법 개발에 관한 연구 : 대두단백 정량을 위한 항체생산 및 특성조사. 한국식품과학회지 24(3): 204-208.

김천제, 김종배, 김병철, 이승배, 정성원, 최도영, 고원식. 1992. 육제품에 첨가된 대두단백 정량을 위한 면역분석법 개발에 관한 연구 : ELISA에 의한 고기유화물 및 시판육제품에 첨가된 대두 단백질 정량. 한국식품과학회지 24(5): 397-403.

Hitchcock, C.H.S., F.J. Bailey, A.A. Crimes, D.A.G. Dean, and P.J. Davis.

1981. Determination of soya protein in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *J. Sci. Food Agric.* 32: 157-165.

Iwabuchi, S. and F. Yamauchi. 1987. Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. *J. Agric. Food Chem.* 35: 200-205.

Iyengar, R.B. and P. Ravestein. 1981. New aspects of subunit structure of soybean glycinin. *Cereal Chem.* 58(4): 325-330.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Meisel, H. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting using IgY antibodies against soybean glycinin A. *Int. Dairy J.* 3: 149-161.

Ravestein, P. and R.A. Driedonks. 1986. Quantitative immunoassay for soya protein in raw and sterilized meat products. *J. Food Technol.* 21: 19-32.

Rittenberg, J.H., A. Adams, J. Palmer, and J.C. Allen. 1987. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for determination of soy protein in meat products. *JAOAC* 70(3): 582-587.

Skerritt, J.H. 1990. Immunoassay of non-meat protein additives in foods. In *Development and application of immunoassay for food analysis* (Rittenberg, J.H. ed.). Elsevier Appl. Sci., London & New York, Pp.81-125.

Yamashita, H., T. Nakatsuka, and M. Hirose. 1995. Structural and functional characteristics of partially disulfide-reduced intermediates of

ovotransferrin N lobe. *J. Biochem.* 270(50): 29806-29812.

Haza, A.I., Morales, P.M., Martin, R., Garcia, T., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B., and Hernandez, E. 1995. Immunoreactivity of goat's milk casein fractionated by ion-exchange chromatography. *J. Agric. Chem.* 43:2025-2029.

Bitri, L., Rolland, M.P., and Besancon, P. 1993. Immunological detection of bovine caseinomacropeptide in ovine and caprine dairy products. *Milchwissenschaft* 48:367-371.

Anguita, G., Martin, R., Garcia, T., Morales, P., Haza, A.I., Gonzalez, I., Sanz, B., and Hernandez, P.E. 1996. Immunological characterization of bovine casein fractionated by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). *Milchwissenschaft* 51:21-25.

Auguita, G., Martin, R., Garcia, T., Morales, P., Haza, A.I., Gonzales, I., Sanz, B., and Hernandez, P.E. 1995. Indirect ELISA for detection of cows' milk in ewes' and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine beta-casein. *J. Dairy Sci.* 62:655-659.

Auguita, G., Martin, R., Garcia, T., Morales, P., Haza, A.I., Gonzales, I., Sanz, B., and Hernandez, P.E. 1996. Immunostick ELISA for detection of cow's milk in ewe's milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein. *J. Food Prot.* 59:436-437.

Allen, J.C. and Smith, C.J. 1987. Enzyme-linked immunoassay kits for routine food analysis. *TIBTECH* 5:193-199.

Rolland, M.P., Bitri, L., and Besancon, P. 1993. Polyclonal antibodies

specificity against bovine alpha s-casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *J. Dairy Res.* 60:413-420.

Fox, P.F. and Guiney, J. 1972. A procedure for the partial fraction of the alpha s-casein complex. *J Dairy Res.* 39:49-52.

Breton, C., Thanh, L.P., and Paraf, A. (1988) Immunochemical properties of native and heat denatured ovalbumin. *J. Food Sci.* 53: 222-225.

Breton, C., Thanh, L.P., and Paraf, A. (1988) Immunochemical identification and quantification of ovalbumin additive in canned mushrooms. *J. Food Sci.* 58: 226-230.

Breton, C., Thanh, L.P., Dubray, G., and Paraf, A. (1989) Apparent discrepancies between immunochemical methods used for ovalbumin recognition in food. *J. Sci. Food Agric.* 47: 311-325.

Varshney, G.C. and Paraf, A. (1990) Use of specific polyclonal antibodies to detect heat treatment of ovalbumin in mushrooms. *J. Sci. Food Agric.* 52: 261-274.

Varshney, G.C., Mahana, W., Filloux, A.M., Venien, A., and Paraf, A. (1991) Structure of native and heat-denatured ovalbumin as revealed by monoclonal antibodies: epitope changes during heat treatment. *J. Food Sci.* 56: 224-233.

秋元政信, 栗崎純一, 山口尚子 (1992) 卵蛋白質の定量精誠分析方法. 日本特許公報, 平4-132959.

원료육 단백질의 식별법 개발 (협동과제-1)

Development of Systems for the Speciation of
Meat Proteins

1998. 12. 20

연구기관
상지대학교

여 백

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “첨단분석기법을 이용한 미량비타민의 분석, 원료단백질의 식별 및 수입육의 평가시스템 개발” 과제 (세부과제 “원료육 단백질의 식별법 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 손 동 화

협동연구기관명 : 상 지 대 학 교

협동연구책임자 : 정 구 용

연 구 원 : 황 보 식

연 구 원 : 배 윤 정

연 구 원 : 박 준 일

연 구 원 : 맹 진 욱

여 백

요 약 문

I. 제 목

원료육 단백질의 식별법 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

2001년 축산물 국제시장개방에 따른 축산물거래의 국제시장자유화는 축산물의 수입개방을 본격적으로 증가시켰으며, 이에 따라 수입 축산물의 시장점유율이 점차 증가하고 있다. 따라서 국내 축산관련 산업은 더욱 위축되어 지리라 생각되어진다. 또한 국내의 IMF환경에 따른 내수축소, 경기불황은 더욱 수입의존도가 높은 산업인 경우, 많은 문제점을 내포하고 있다. 수입제품의 유통기한 연장 및 냉동수입육의 유통이 허용되기 시작하면서, 1997년 외국산 수입육 및 그 육제품이 국내 유통시장의 약 50%이상을 차지할 정도로 잠식의 속도가 빨라지고 있다. UR협상타결과 WTO체제출범에 이어 최근 냉장육 유통시장개방으로 외국으로부터 냉장육 상태의 각종축육이 대량 반입될 것으로 예상된다. 따라서 우리 나라 고유의 신토불이 축종자원의 보호육성을 위한 대응전략이 그 어느 때 보다 절실히 요구되어지고 있다. 예를들어 각종 축종중 품종의 구별은 외형적 특징인 털색, 체형들의 표현형에 의존하는 방법이 없기 때문에 표현형으로 나타나지 않는 유전형질에 대해서는 판별할 방법이 없다. 따라서 소의 경우 쇠고기 상태로 변화한 후의 육질의 품종 판별은 불가능하게 된다. 국내 수입쇠고기 물동은 1992년에 쇠고기 전 소비량의 56%를 차지하고 있으며, 한우고기 값이 수입쇠고기 보다 비싸기 때문에 수입 냉장육의 수입에 의한 한우육의 소비량 저하 및 한우고기로의 둔감현상 등이 더욱 국내 축육산업을 위축시킬 것으로 전망된다. 또한 육종의 판별관계로 인한 법정문제가 야기될 경

우, 이를 해결할 과학적인 증명방법이 없는 현실로 보아 기술개발의 필요성이 시급히 해결되어야 할 과제로 대두되고 있다. 최근 쇠고기에 대한 소비자 기호도를 조사한 결과 수입소고기를 찾는 이유중의 37%가 한우고기를 속아서 살 염려가 없기 때문이라고 응답하고 있는 실정이다.

동물의 축종이나 그 품종의 구별은 외형적 특징을 이용하여 구별하는 것이 가장 손쉽게 구별하는 일반적인 방법이지만, 도축하여 가공제품 형태로 전환되거나, 원료육의 혼합물 상태로 존재하면 원료육의 판별은 거의 불가능하게 된다. 그 동안 축육자원의 축종 판별을 위한 기술로서 외관적 검사, 관능적 검사법, 혈청학적 검사법, 이화학적 검사법, 생화학적 검사법 및 면역학적 방법 등이 많이 이용되어지고 있으며, 그 중에서 면역효소 측정법(Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA)과 동전질 전기영동기법을 이용한 단백질 전기영동 방법이 축종판별에 비교적 정확도가 높은 방법으로 사용되어졌다. 면역 분석법은 특정 단백질 항원에 대한 특이성을 가지고 있는 항체를 사용하여 임신 진단 또는 병의 감염여부를 알아내는 진단법으로 이용되어 왔다. 항원-항체 반응의 기본 기전이 항원에 존재하는 항원 결정기(epitope)에 대한 항체의 인식에 의한 결합반응이라는 것을 착안하여, 항원의 변성이 항원 결정기의 구조적 변화를 야기시키고 이런 구조적 변화에 대한 항체의 인식정도를 결합반응으로서 나타낼 수 있다. 그러므로 변성된 단백질과 그의 항체는 결합 반응 정도가 비 변성 단백질 보다는 더 낮게 나타나게 되며 이 원리를 이용하여 변성도를 측정할 수 있다. 또한, 변성된 단백질에 대한 결합성은 변성시킨 성분에 대한 항체를 생산하여 같은 조건에서 이러한 항원을 검출한다면, 항원의 변성도 뿐만 아니라 변성된 원료육 중에 함유되어 있는 특정성분의 검출도 용이하게 수행할 수 있으리라 사려된다.

축산물 수입개방은 소비자로 하여금 질적으로 우수하며 다양한 외국의 많은 육가공제품을 접할 기회가 많게 될 전망이다. 이에 수입육제품과 국내제품의 실질적인 질적 품질검사인 이중축융검사(우육→돈육, 돈육→계

육, 칠면조육, 계육→어육)법의 개발이 절실히 요청되어지고 있다. 또한, 육가공 제품 제조시 수분첨가를 향상시키는 이종 단백질(대두단백, 우유단백, 혈청단백)의 검사는 소비자의 경제적 불이익을 방지하고 무분별한 육제품 수입을 통제하며 국내 제품의 질적 향상을 도모할 것으로 예상된다.

서구유럽에서는 육가공제품의 규격화 내지 표준화를 위하여 법적으로 사용허용량을 엄격히 제한하고 있고 함량표시를 반드시 규정하고 있으며, 수시로 제품검사를 실시함으로써 유럽이 통합된 후에도 자국민의 보건복지에 힘을 기울이고 있다. 그러나 국내에서는 이에 대한 법적 규제도 구체화되어있지 않고 제품에도 함량을 표시하고있지 않고 또 정확한 검사 기술도 축적되어 있지 못하여, 외국에서 저급의 육가공품이 부분별로 수입될 경우 실제로 이를 규제 검사할 수 있는 능력이 부족하며 또한 신속히 판정할 수 있는 기술이 연구되지 않아 어려움이 많다. 따라서 육제품의 가열 변성된 단백질의 특이성과 그 문제점을 해결해야 할 연구가 필요하였다.

축종별 특이적으로 발현되고 있거나 일정 peptide배열이 다른 것은 충분히 예측되고 있으나, 육을 가열하거나 염으로 처리될 경우 추출되는 단백질 또는 열변성되는 단백질이 대부분인 것으로 알려져 있다. 또한 가열 변성된 단백질은 불용화하며, 이를 가용화시키기 위해서는 강력한 계면활성제를 사용하여야 한다. 그러나 일정 온도에서 열변성되는 성분은 축종에 따라 상이하며, 내열성 성분의 조성 또한 다르다. 일반적으로 축종별 육은 비가열 상태에서는 육안으로라도 판별이 가능할 정도로 상이한 근섬유 조직으로 구성되어 있으나, 가열하면, 단백질이 변성되어 육안으로 구분하기는 매우 어려우며 이러한 현상은 육혼합물일 경우 더욱 곤란하다. 생산 원료비의 절약을 위하여 사용되고 있는 이종단백질을 판별하고, 실제 제품에 표기된 함량의 신뢰도를 향상시켜 소비자를 보호하고 축육제품 산업을 발전시키기 위해서는 정확하고 객관적인 원료육의 판별이 매우 중요하다는 관점에서 본 연구는 매우 중요한 의미를 갖고 있다.

따라서 다양한 소비자의 욕구를 충족시키고 수입 육제품의 품질검증과

국내 육제품의 고급화를 위하여 첨가되는 원료육의 함량을 정확하고 객관적으로 측정하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 본 연구진은 계육, 돈육, 그리고 우육 특이적인 항체를 생산하였으며, 이를 이용하여 육 혼합물 중에 혼입되어 있는 원료육의 함량을 검증하는 방법을 모색하였다. 또한 시중에 유통되고 있는 축육제품 및 현장성 검증을 위하여 원료육 함량을 달리한 소시지를 직접 제조하여 실용성을 검증하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 축종별 특이적인 항체를 생산하여 면역학적 기법을 이용한 원료육 단백질의 식별법을 확립하기 다음과 같이 실시하였다.

구분	연구 개발 목표	연구 개발 범위
1 차 년도 (1996)	1. 원료육의 지표단백질의 선택	- 돈육의 육단백질의 추출 및 조성성분의 분석 - SDS-PAGE에 의한 지표단백질의 검증 및 선별
	2. 가열 계육의 구성단백질의 변성도 검증	- 가열 및 비가열 돈육 성분의 비교분석 - 가열육제품중의 돈육 검색
	3. 항혈청을 이용한 ELISA System의 확립	- 토끼에 의한 면역 - Rabbit anti-chicken IgG의 분리 및 정제 - 가열 및 비가열육에 대한 역가검증법 확립 - ELISA를 이용한 육제품중의 돈육 함량 평가방법의 확립
2 차 년도 (1997)	1. 원료육의 지표단백질의 선택	- 닭의 육단백질의 추출 및 조성성분의 분석 - SDS-PAGE 및 lectin staining을 통한 지표단백질의 검증
	2. 가열 육제품의 원료육 측정 System의 개발	- 가열 및 비가열 한우육의 구성단백질의 비교분석 - 가열육제품중의 닭고기 검색
	3. 항혈청을 이용한 ELISA System의 확립	- 면역 - Affinity chromatography에 의한 anti-rabbit IgG의 정제 - 가열 및 비가열육의 ELISA System을 이용한 단백질 변성도 측정 - ELISA를 이용한 육제품중의 닭고기 함량 평가방법의 확립
3 차 년도 (1998)	1. 원료육의 지표단백질의 선택	- 한우육의 육단백질의 추출 및 조성성분의 분석 - SDS-PAGE 및 lectin staining을 통한 지표단백질의 검증
	2. 가열 육제품의 원료육 측정 System의 개발	- 가열 및 비가열 한우육의 구성단백질의 비교분석 - 가열육제품중의 한우육 검색
	3. 단일 항체의 선별 및 원료육 판별법의 확립	- ELISA 및 Immunoblotting에 의한 Screening 및 항체의 선별 - 단일 항체를 이용한 한우육 및 기타 축종별 원료육의 판별법 개발 - 육제품중의 한우육 함량 측정법의 개발

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 돈육의 식별법 개발

축종별 원료육 지표단백질을 선택, 실용화하기 위한 기본적인 조건은 수용성, 염용성, 난용성 단백질중 세포막으로부터 분리 정제가 간편하고, 재현성이 우수하며, 종 특이적으로 발현되는 성분이어야만 한다. 이러한 관점에서, 먼저 수용성 및 염용성 단백질을 비교 분석한 결과, 단백질의 추출량은 생리 식염수를 사용한 경우 그 함량이 많아졌지만, SDS-PAGE에 의한 분석결과, 단백질의 생화학적인 특성을 유지하고 현상에서의 활용 방안을 고려하였을 때, 돈육중의 수용성단백질을 이용하는 것이 가장 타당한 것으로 확인되었다.

돈육 특이적인 성분을 검색한 결과, 약 32kDa 및 55kDa의 성분이 돈육에 있어서 종 특이적으로 발현되고 있는 것이 발견되었다. 또한 75°C에서 30분간 가열처리 한 돈육의 경우, 계육 및 우육과 상이한 성분이 내열성 성분으로 존재하고 있는 것이 확인되어, 가열 돈육을 총 4회에 걸쳐 면역한 후, 복합항체를 생산하였다. 비가열 및 가열(75°C/15분) 수용성 돈육단백질 100 μ g/ml를 100 μ l/well로 coating한 후, 생산된 항혈청을 각각 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000으로 희석하여 그 역가를 ELISA검사법(Screening法)을 실시하여 측정한 결과, 1:32,000으로 희석한 항혈청의 경우, O.D 405nm에서 가열돈육 0.2이상, 비가열 돈육 0.07을 나타내었다.

돈육과의 경합반응에서 0.01 μ l/well에서 경합이 시작되었으며, 그 이상의 농도에서 직선적으로 역가가 감소하고 있는 것이 확인되어, 본 연구에 의해 만들어진 돈육 복합항체는 돈육과 특이적으로 결합하고 있는 항체임이 입증되었다. 그러나, 우육, 계육, 염소육, 칠면조육, 오리육, 토끼육, ISP, 그리고 계란단백질과는 전혀 경합이 발생하지 않는 것이 확인되었다. 따라서 iELISA에 의해 강하게 반응한 우육 및 계육은 돈육 복합항체

와는 비특이적으로 반응하며, 이러한 비특이적인 반응은 돈육과의 결합에 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 비가열육의 결과와 유사하게 나타났으며, 이는 ciELISA에 의해 육혼합물 중의 돈육을 검증할 수 있다는 것이 확인되었다. 또한 100%돈육 가열혼연 소시지(프랑크푸르트형 소시지)를 1.0% SDS를 이용하여 추출한 후, 75°C/15분간 가열한 후 분취한 내열성 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 돈육을 검증할 수 있음이 확인되었다. 따라서 본 연구진에 의해 생산된 돈육 특이적인 항체를 이용하여 원료육 혼합물은 물론이고 가열 축육제품중에 혼입되어 있는 돈육의 양을 정량적으로 분석할 수 있음이 확인되었다.

2. 계육의 식별법 개발

증류수, 0.85% NaCl, 0.5% SDS, 그리고 0.5% Triton X-100을 이용하여 계육의 추출량을 비교 분석한 결과, 증류수에서는 가슴부위 19.2, 갈비부위 17.4, 다리부위 18.8 μ g/g protein이 추출되었으며, 부위별 유의적 차이는 없었으며, SDS-PAGE에 의한 분석에서도 부위별 특이적인 성분은 검출되지 않았다. 또한 추출용매에 따른 축종별 특이적 성분은 검출되지 않아 증류수를 이용하여 추출한 단백질을 이용하여 본 연구를 실시하였다.

증류수를 이용하여 계육, 한우육, 홀스타인육, 그리고 돈육을 처리하여 회수한 가용성 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 약 50 kDa 이 특이적인 성분으로 확인되었으며, 이 성분을 SDS-PAGE법으로 정제한 결과, 약 80%의 회수량을 나타내었다. 따라서 본 연구진에 의해 확립한 단백질 정제법은 항체를 생산하기 위한 면역원의 정제에 필요한 막대한 시간과 예산을 절약할 수 있는 매우 간단하고 신속한 방법으로써, 단백질에 대한 연구는 물론이고 단일 항체 생산에 필요한 항원의 조제방법으로 크게 이용될 수 있으리라 사려된다.

50kDa에 대한 이 항체의 특이성을 검사하기 위하여 Immunoblotting

을 실시한 결과, 50kDa 성분과 특이적으로 반응하고 있는 것이 확인되었다. 또한 계육, 한우육, 돈육, 그리고 ISP를 70°C에서 30분간 가열한 후, 15,000rpm으로 15분간 원심분리하여 열변성된 성분을 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과, 비가열육과 동일한 결과를 나타내었다.

비가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 0.05 μ g/well의 계육 함량에서부터 강한 경합반응을 나타내었으며, 그 이상의 계육의 량에서는 거의 직선적인 경합을 나타내었다(Fig. 2-12). 그러나 돈육, 오리육, 그리고 칠면조육에서는 거의 경합이 일어나지 않는 것이 확인되었으나, 우육의 경우, 500 μ g/well 이상에서 약 50%의 경합이 일어나는 것으로 나타났으나, 이는 계육의 10⁻¹의 감도로써 큰 문제점은 없을 것으로 사려된다. 가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 비가열 계육보다 강한 경합반응을 나타내었으며, 이는 항원으로 가열 계육 성분을 사용하였기 때문이라 사려된다. 또한 비가열 우육과 반응한 계육 복합항체는 그 항원으로 가열육을 사용함으로써 교차반응이 거의 없는 것으로 나타났으며, 그 이외의 이종 단백질들과는 거의 반응하지 않는 것이 확인되어, 계육 복합항체를 이용한 ciELISA에서 계육의 검증은 충분히 가능할 것으로 확인되었다. 조제한 순수한 계육 소시지를 0.5% SDS를 이용하여 추출한 후, iELISA를 실시한 결과, 역가가 비가열 계육보다 약 50%감소하였으나, iELISA에 의해 충분히 검출가능한 역가로 판단되어, 본 연구진에 의해 작성된 계육 복합항체를 사용함으로써 육혼합물, 또는 육제품중에 혼입되어 있는 계육을 정량적으로 검사할 수 있는 것이 확인되었다.

계육 복합항체를 이용하여 Dot blotting을 실시한 결과, 계육의 검출한계는 1 μ g/well이었으며, 이러한 검출강도는 계육의 함량에 대하여 의존적이었다. 그러나, 이러한 검출감도는 ELISA에 비하여 매우 낮은 것이지만, 분석의 간편성 및 정성적 분석을 추구할 경우 충분한 검출감도라 판단되었다. 시중에 유통되고 있는 비엔나소시지(돈육 90.14%), 불고기햄(계육 28.89%, 칠면조 31.44%), 그리고 캔터키프랑크소시지(계육 46.52%, 돈육

24.92%)를 구입하여 수용성 단백질을 추출한 후, 100℃에서 30분간 가열하여 분석한 결과, 농도 의존적으로 반응하여, 계육 특이적인 항체를 이용하여 육제품 중에 혼입되어 있는 계육을 검증할 수 있음이 확인되었다.

3. 우육의 식별법 개발

증류수, 0.85% NaCl, 0.5% SDS, 그리고 0.5% Triton X-100을 이용하여 우육을 추출한 결과, 부위별 추출량 및 특이성분은 검출되지 않았다. 증류수로 추출한 한우육, 홀스타인육, 돈육 및 계육을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 17% SDS-PAGE분석에 의해 한우육의 19.3kDa성분이 축종특이적 성분으로 확인되었으며, 이 성분은 홀스타인 육에서도 동일하게 검출되었다. 19.3kDa을 SDS-PAGE법으로 정제한 결과, 약 27.6%의 회수율을 나타내었다.

100℃로 가열할 경우, 우육은 약 83% 열 변성되어 침전하였으나 계육은 약 78% 열변성 하는 것으로 나타났다. 또한 우육을 100℃에서 30분간 가열한 후, 그 내열성 획분을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 19.3kDa이 열에 매우 강한 것으로 확인되었다. 100℃/30분간 가열한 후 회수한 내열성 획분을 3회에 걸쳐 토끼에 면역한 후(1mg/회), ELISA를 이용하여 그 역가를 검사하였다. 그 결과, 가열 우육은 비가열 우육보다 전체적으로 높은 역가를 나타내었으며, 1:32,000의 희석비율에서도 0.3이상의 O.D. 값을 나타내었다. 우육 복합항체와 돈육 및 계육과의 교차반응을 검사한 결과, 우육 복합항체는 돈육 및 계육과 강한 교차반응을 하고 있는 것이 확인되었다. 우육 복합항체에 대한 우육, 돈육, 계육, 염소육, 오리육, 칠면조육, 토끼육, ISP, 그리고 계란 단백질의 ciELISA를 실시한 결과, 우육은 0.1 μ g/well에서부터 강한 경합반응이 일어나는 것이 확인되어, 본 연구에 의해 작성된 우육 복합항체는 우육 단백질과 특이적으로 결합하고 있는 것으로 나타났다. 돈육 및 칠면조의 경우 약한 경합을 일으키고 있었으나, 우육의 검증에는 큰 영향을 일으키지 않는 수준이었으며, 기타 육 단백질은 전혀 경합반응이 일어나지 않는 것으로 확인되었다. 가열 육단백질과 우육 복합항체

와의 경합반응을 조사한 결과, 비가열 육과의 경합반응보다 약하게 일어나고 있는 것이 확인되었으나, 비가열육의 결과와 유사하게 나타났다. 따라서 본 연구에 의해 작성된 우육 특이적인 복합항체를 이용할 경우, 원료육 혼합물 및 축육제품중에 혼입되어 있는 우육의 검증은 가능할 것으로 확인되었다. 이를 이용한 분석법을 실용화할 경우, 축육제품 중의 원료육을 정확하고 객관적으로 분석할 수 있을 것이며, 특이적인 항체를 이용한 분석 Kit의 개발도 가능하리라 사려된다.

Dot blotting을 이용하여 내열성 우육 단백질에 대한 복합항체 검출한계를 측정된 결과 약 $10\mu\text{g}/\text{well}$ 이었으며, 농도 의존적인 감도를 나타내었다. 원료육 혼합물 또는 가공 육제품중에 혼입되어 있는 우육은 양적으로 매우 많으며, 농도가 매우 낮더라도 농축하는 것이 매우 간단하므로, 비록 ELISA의 검출감도보다 매우 낮은 수준이지만 그 실용성을 감안할 때, Dot blotting은 그 이용차기는 매우 크며, 현장적용을 위한 검출 Kit의 개발도 가능하리라 사려된다.

4. 활용방안

본 연구는 원료육 단백질을 검출하기 위한 것으로, 최근 크게 문제가 대두되기 시작하고 있는 축육제품중의 저급 및 이종단백질의 검출법을 확립하기 위하여 실시하였다. 각 축종별 특이항체를 생산하여, 면역학적 기법을 이용하여 그 원료육을 검색하였다.

그 결과,

첫째, 축종 특이적 성분에 대한 복합항체를 생산하였고, 축종별 또는 단백질 및 표준 곡선을 작성하여 그 함량측정의 정확성을 확립하였다.

둘째, 가열·비가열 원료육 단백질의 분석 system을 정립하였고 ELISA를 이용한 분석법을 개발하여 시중 육제품 중의 이종 단백질 함량분석법을 개발하였다. 또한 Dot-blotting을 이용한 평가모델을 개발하여 교차검증법을 확립하였다. 이러한 결과를 토대로 본 연구의 성과를 활용하는 방안을

살펴보면 다음과 같다.

(1) 축종별 특이성분의 검색을 실시한 결과, 각 축종별 특이성분이 존재하고 있는 것을 밝혔으며, 이를 이용한 특정성분의 혼입을 정성적으로 검증할 수 있게 되었다. 따라서 축육이 아닌 이종단백질이 첨가되었을 경우, 간단히 SDS-PAGE만 실시하더라도 검색하고자 하는 성분을 알 수 있으며, 이를 이용한 정확하고 객관적인 검색이 가능하게 되었다.

(2) 축종별 특이항체를 이용하여 immunoblotting을 실시할 경우, 극히 미량의 성분이라 하더라도 그 검색이 가능하며, densidometer등을 이용한 정량적 분석도 가능하다. 특히 내열성 단백질을 이용하여 축종별 특이항체를 작성한 관계로 가열 축육제품의 검증에도 본 항체를 사용할 수 있어 그 이용가치는 매우 높다고 할 수 있다.

(3) 본 연구진이 확립한 SDS-PAGE법에 의한 peptide의 정제법은 그 방법이 매우 간단하며, 회수율이 높다. 따라서 축종별 특이항체를 생산하기 위한 단백질성 면역원의 생산을 위한 많은 시간과 노력을 절약할 수 있게 되어 앞으로의 연구에 매우 큰 힘이 되리라 생각한다. 또한 이러한 방법을 보급하므로써 본 연구와 같은 어떤 특정 성분에 대한 특이항체의 생산을 비롯한 면역학적 분야와 peptide의 생화학적 분석을 위한 연구에 크게 기여할 수 있을 것이다.

(4) 일반적으로 논의되고 있는 복합항체의 교차반응은 ciELISA에 의하여 완전히 극복할 수 있게 되어, 비록 생산된 항체의 특이성이 떨어지더라도 축종식별을 위한 연구 등의 분야에 손쉽게 사용할 수 있는 기법을 확립하였다. 특히 본 연구진에 의해 생산된 돈육 및 계육은 그 특이성이 뛰어나기 때문에 검출 Kit 등의 개발을 통한 상품화의 가치가 매우 높다고 볼 수 있다. 따라서 이러한 항체의 상품화를 위한 국내 제약회사 등과의 공동 연구는 물론이고 현장 실용화를 위한 지속적인 연구비의 지원이 필요하다고 사려된다.

(5) 본 연구진이 수행한 Dot-blotting법은 그 방법이 매우 간단하고 1

회 검증할 수 있는 시료의 수가 ELISA와 동일하며, 또한 시료 용액의 농축이 용이한 관계로 그 현장 적용성이 매우 뛰어나다고 할 수 있다. 이 실험 기법은 특별한 기술이 필요 없으며, 일정 항원 량에 대한 검출감도를 영상화하여 제작해 들 경우 현장에서 매우 손쉽게 사용할 수 있는 방법이라 사려된다. 따라서 본 연구진에 의해 확립된 방법은 그 의미가 매우 크다고 할 수 있으며, 본 검증기법을 보다 객관성 있게 수행하기 위한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 생각한다.

(6) 본 연구진에 의해 만들어진 축종별 특이항체를 이용할 경우, ciELISA, dot blotting, 그리고 immunoblotting 등의 기법에 의해 원료육 혼합물은 물론이고 가열 축육제품 중에 혼입되어 있는 특정 육단백질의 유무 및 함량을 측정할 수 있으리라 사려된다. 따라서 이를 실용화하기 위한 지속적인 연구를 위하여 더 많은 지원이 따라야 할 것으로 생각한다.

SUMMARY

To determine the species-specific raw meat samples, meat proteins should be easily extracted and purified from the cell membrane, species-specific marker components should be identified, and identification method should be reliable and reproducible. Pork, chicken meat and beef identification methods were developed in this project.

1. Development of Pork Identification Method

The components of approximately 32 and 55 ada were specifically found in pork. Heat-resistant, pork-specific components were observed when meat samples were treated at 75°C for 30 min. Titration study using LISA in which polygonal antibody against heat-treated pork-specific meat protein as antigen was employed, demonstrated that AD values at 405 nm were 0.2 and 0.07 in heat-treated and non-treated pork, respectively at 1:32,000 dilution of the antibody. LISA study using pork-specific polygonal antibody showed that the antibody reacted specifically with pork rather than beef, chicken, goat, turkey, duck meats, ESP or egg protein. And this antibody also reacted with meat proteins extracted from pork Frankfurt sausage treated at 75°C for 15 min, demonstrating that pork-specific antibody produced in the present study would be applied for qualitative and quantitative determination of raw meat as well as processed meat products.

2. Development of Chicken Meat Identification Method

The amounts of meat proteins in various parts of chicken meats extracted with H₂O, 0.85% NaCl, 0.5% SDS or 0.5% Triton X-100 were not significantly different. SDS-PAGE study demonstrated that water-soluble protein components of about 50 kDa were found specifically in chicken meats. Immunoblotting study in which polyclonal antibody against chicken meat-specific protein component (50 kDa) demonstrated that this antiserum reacted specifically with this component. Indirect competitive ELISA (ciELISA) study using non-treated meat proteins demonstrated that strong competition occurred from 0.05 ug of chicken meat per well. When pork, duck or turkey meats were used, no competition was observed. Although beef at the concentration of 500 ug/well showed 50% competition, it would be negligible because the detection limit was very low (10^{-4}) compared with that for chicken meats. Dot blotting study using chicken-specific polyclonal antibody demonstrated that detection limit was 1 ug/well. Although the sensitivity of dot blotting was lower compared with ELISA, dot blotting would be acceptable specially for qualitative analysis and rapid determination. Chicken-specific antibody also reacted, in dose-response manner, with meat proteins from processed meat products, such as Vienna sausage (pork 90.14%), Bulgogi Ham (chicken 28.89%, turkey 31.44%) or Kentucky-Frank sausage (chicken 46.52%, pork 24.92%) treated at 100°C for 30 min, demonstrating that pork-specific antibody produced in the present study would be applied for qualitative and quantitative determination of raw meat as well as processed meat products.

3. Development of Beef Identification Method

The amounts of meat proteins in various parts of beef extracted with dH₂O, 0.85% NaCl, 0.5% SDS or 0.5% Triton X-100 were not significantly different. SDS-PAGE study demonstrated that protein components of 19.3 kDa were found specifically in Hanwoo and Holstein beef, but not in pork or chicken meat samples. This beef-specific protein component were still present after heating at 100⁰C for 30 min. ELISA study using the polyclonal antibody against heat-denatured (100⁰C for 30 min) beef-specific protein component demonstrated that titration was higher in heat-treated beef than in non-treated beef and OD value was higher than 0.3 at 1:32,000 dilution of the antibody. Also ciELISA study showed that strong competition was observed from 0.1 ug of beef per well, however, the antibody had weak but insignificant competition with pork or turkey meats, demonstrating that beef-specific antibody produced in the present study would be applied for qualitative and quantitative determination. Dot blotting study using beef-specific polyclonal antibody demonstrated that detection limit was approximately 10 ug/well. Although the sensitivity of dot blotting was lower compared with ELISA, dot blotting method would be applied for beef identification particularly in outdoors because the method is rapid and easy of practical use.

여 백

CONTENTS

Chapter IV. Development of Systems for the Speciation of Meat Proteins	187
Section 1. Introduction	187
1. Purpose and Importance of Research	187
2. Background of Research	189
Section 2. Materials and Methods	191
Section 3. Results and Discussion	196
Section 4. References	232

여 백

목 차

제 4 장 원료육 단백질의 식별법 개발	187
제 1 절 서 설	187
1. 연구개발의 목적과 필요성	187
2. 연구개발의 배경	189
제 2 절 재료 및 방법	191
제 3 절 결과 및 고찰	196
제 4 절 참고문헌	232

여 백

제 3 장 원료육 단백질의 식별법 개발

제1절 서 설

1. 연구개발의 목적과 중요성

축종감별 및 이종 단백질의 검사방법으로는 HPLC 아미노산 분류방법, 열청학적인 분석법, SDS-PAGE 등 여러 방법이 시도되어 왔으나 가열 처리된 육제품에서의 이종 단백질 검출은 가열변성 단백질의 특성상으로 아미노산 배열의 변화는 거의 없지만, 불용성이 되므로 단백질을 분석 검사하는 것이 문제점으로 현재 연구에 상당히 어려움을 겪고있다.

식육으로 이용되어지고 있는 육의 종류를 외관으로 판정하기는 매우 어려워 현재의 축육판별은 주로 항원항체반응에 의해 행하여지고 있다. 소 및 돼지에 대한 항체는 시판되고 있어 이것을 이용한 축종간의 판별은 가능한 것으로 생각되어지고 있으나, 그 특이성 및 가격적인 면에서 실제로 응용하는데는 여러 가지 문제점이 제시되고 있다. 또한 복합항체의 비특이적인 반응에 의한 정확한 분석법의 확립이 매우 어려운 상황이다. 또한 기원이 유사한 축종간의 판별 및 야생동물의 혼용에 따른 축종간의 식별은 거의 불가능한 것이 현실이다. 또한, W.T.O 체제의 출범과 더불어 무분별한 축산물의 수입개방에 대처하고 육제품의 표준화 내지 규격화를 통한 제품의 향상 및 소비자의 경제적 불이익을 방지하는 일익을 담당할 수 있도록 축종간의 이종단백질을 구별 정량하고, 또한 대두단백 등 비육류단백질의 검사도 가능하도록 하여 실질적인 제품의 규격화 내지 표준화를 달성하기 위한 연구가 활발히 진행되어야 한다.

서구유럽에서는 육가공제품의 규격화 내지 표준화를 위하여 법적으로 허용허용량을 엄격히 제한하고 있고 함량표시를 반드시 규정하고 있으며, 수시로 제품검사를 실시함으로써 유럽이 통합된 후에도 자국민의 보건복지에

힘을 기울이고 있다. 그러나 국내에서는 이에 대한 법적 규제도 구체화되어 있지 않고 제품에도 함량을 표시하고 있지 않고 또 정확한 검사 기술도 축적되어 있지 못하여, 외국에서 저급의 육가공품이 부분별로 수입될 경우 실제로 이를 규제 검사할 수 있는 능력이 부족하며 또한 신속히 판정할 수 있는 기술이 연구되지 않아 어려움이 많을 것으로 예상된다. 따라서 육제품의 가열 변성된 단백질의 특이성과 그 문제점을 해결해야 할 연구가 필요하다.

최근, 원료육의 판별은 물론이고, 변성된 단백질에 대한 항체를 생산하여 그 특이성을 검색하고, 정확도나 특이성에서 우수한 항체를 생산하여 사용하는 Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)법이 개발되어 상기의 문제점 즉, 정확성, 예민성, 객관성을 축종에 따른 특이성 단백질의 연구가 국외에서 활발히 진행되고 있다. 특히 그 동안 이 방법은 예방의학에서 응용된 항원항체법으로써 질병의 조기진단은 물론 예방진단 분석에 이용되어 왔던 고도의 초정밀성을 요하는 효소를 이용한 방법이다. 따라서, 이 System의 응용에 의한 분석법의 확립에 의한 원료육 및 육제품의 가열 변성된 단백질의 검증에 매우 유효 적절한 방법으로 평가되어지고 있다.

따라서 축종별 특이항체를 생산하므로써 보다 신속하고 정확도가 높은 축종별 원료육 단백질의 식별이 가능하게 이루어 질 수 있으며, 또한 육제품 중의 이종단백질의 혼입을 정량적으로 검사하는 객관적인 방법의 정립이 매우 중요하다. 이러한 방법이 정립될 경우, 이종축육을 판별할 수 있는 순수항체 Kit를 개발, 상품화하여 실제 응용할 수 있을 뿐만 아니라 식품위생 연구에서 각종 Toxin, 잔류농약, 잔류항생물질의 확인 등이 가능할 것이며, 새로운 최첨단검사 및 분석방법의 상품화로 국내내수시장은 물론 미국을 비롯한 유럽시장에 다양한 축종간의 식별방법의 기술로 활용될 수 있을 것이다. 이러한 관점에서 볼 때, 본 연구의 중요성은 매우 높으며, 그 응용가치도 매우 광범위하다고 할 수 있을 것이다.

2. 연구개발의 배경

식품산업의 발달과 시장개방화로 외국산 농축산물과 그 가공제품들이 국내시장에 많이 유통되고 있으며, 그 차지하는 비율도 점차 증가하고 있는 추세에 있다(1997년도 국내 육제품 시장의 약 50%를 차지할 것으로 전망). 특히 식육 중에서 쇠고기는 국내 소비량의 절반이상이 수입에 의존하고 있고, 그 비율은 앞으로 더욱 높아지리라 예상되기 때문에 국내 축육의 보호 및 경쟁력향상을 위한 판별 검사 방법의 확립이 절실히 요구되어지고 있다.

육종감별에 관한 연구는 세계각국에서 오랫동안 수행되어져 왔으며, 그 방법으로는 관능평가에 의한 방법, 면역학적 방법, 조직화학적 방법, 생화학적 방법, 물리화학적 방법 등이 있지만, 이중에서도 종특이적 단백질 검출 및 판정결과의 해석 등의 관점에서 볼 때 항원항체 반응을 이용한 면역법과 전분 및 Polyacrylamide 등을 지지매체로 하는 전기영동법이 비교적 효과적인 방법으로 알려져 있으며 이들 방법은 동물들간의 이종단백질, 즉 구성 단백질의 차이를 검출하여 축종을 판별한다. 그러나 이들 방법은 소, 말, 돼지, 닭 등 서로 다른 축종간에 생육, 가열육 및 이종 혼합육 등에서 육종 감별이 가능하나 한우, 젖소, 육우 등 축종간에 식별을 거의 불가능한 것으로 알려져 있다.

유통되는 육류의 명확한 축종 판별은 늘어나는 육류 수입량에 비추어 볼 때 필수적인 단계로써 선진 외국에서는 일상적으로 검사하고 있는 실정이나 국내에서는 아직 엄두를 내지 못하고 있다. 선진 외국에서는 이러한 축종 판별 문제에 일찍부터 관심을 기울여 많은 연구가 수행되어 있다. 현재 축종 판별에 이용되는 방법에는 면역학적 방법(Hayden, 1979; Berger 등, 1988), 전기영동법(King과 Kurth, 1982; Sotelo 등, 1993), 기기분석법(Sinclair 등, 1982; Armstrong과 Leach, 1992)등이 있으나, 이러한 생화학적 방법들은 시간이 너무 많이 소요되는 단점 때문에 신속성을 요구하는 검사의 특성상 완전한 대안이 되기가 어렵다. 더욱이 국내의 경우 한우육

과 기타 우육을 판별하고자 하는 시도(강 등, 1992)들이 있었으나 성과는 미비한 실정이다.

최근에는 분자생물학적 기법이 발전하면서 DNA을 이용한 기법이 축종 판별에도 도입되었다.(Wintero와 Thomsen, 1990). 이 방법은 종간의 차이가 DNA 염기 서열의 차이에서 기인한다는 것을 근거로 하기 때문에 매우 밀접한 관계에 있는 종간의 구분도 가능하게 해준다. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNAs)는 최근에 개발된 분자생물학적 기법(Williams 등, 1990; Welsh와 McClelland, 1990)으로 PCR(Polymerase Chain Reaction; Mullis와 Faloona, 1987)을 응용한 방법이다. RAPD의 이러한 장점 때문에 여러 분야에서 응용되고 있으며 신속한 축종 판별 뿐만 아니라 동 축종내 품종 판별을 위해서도 응용되고 있다. (Kemp와 Teale, 1994; Gwakisa 등, 1994). 국내에서도 RAPD에 관심을 기울여 조와 한 (1994)과 이 등(1994)에 의해서 한우 특이적인 RAPD표지 인자를 찾고자하는 연구가 실시되었다. 그러나 정통 한우의 유전자가 보존되어 있지 않고, 또한 그 유전자의 염기배열을 모르고 있는 국내 환경으로 볼 때, 이러한 분자생물학적 방법의 응용도 많은 문제점을 내포하고 있다. 또한 육제품 중에 포함되어 있는 이종 단백질의 검색 및 그 함량을 측정하기 위해서는 거의 불가능하기 때문에, 신속하고 정확하며, 객관성 높은 검출방법의 개발이 절실히 요구되어지고 있다.

따라서, 비가열 및 가열 변성 원료육 단백질을 검색하기 위해서는 이러한 2가지의 항원에 대해 모두 반응하면서 축종별 특이적인 항체를 생산하여야 한다고 할 수 있다. 또한 항체의 교차반응을 없애고 정확한 검색기법을 확립하기 위한 새로운 연구의 개발도 시대적으로 요구되고 있다고 할 수 있다. 이러한 관점에서, immunoblotting, dot blotting, 그리고 다양한 ELISA기법을 이용하여 새로운 원료육 단백질의 검색 기법을 확립하고자 한다.

제2절 재료 및 방법

1. 재료

계육의 경우 일반적인 브로일러종으로써 도살한지 24시간 이내의 신선한 육으로 평균 도체 지육 체중이 1kg 미만인 것을 구입해서 사용하였으며, 한우육 및 돈육의 육 시료는 품종별 각각 10두씩 도축장에서 각각 300g의 정육을 채취하여 단백질 추출용 시료로 사용하였다. ISP는 천양교역으로부터 구입하여 사용하였다. 유통되고 있는 시중 육제품은 원주시내의 슈퍼마켓에서 구입하여 사용하였으며, 계육 함량별 가열 훈연소시지는 건국축산식품에서 제조하여 사용하였다. SDS, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Triton X-100, bovine serum albumin (BSA), molecular weight marker, Folin-Ciocalteu's, peroxidase labelled anti-rabbit IgG, alkaline phosphatase labelled anti-rabbit IgG, *p*-nitrophenylphosphate disodium salt, Sodium azide, acrylamide, bis-acrylamide, Tween-20, H₂O₂ 시약은 Sigma Co. (USA)로 부터 구입하였다. Polyvinylidene fluoride (PVDF)막은 Bio-Rad (USA)로 부터 구입하였으며, 축육제품의 조제에 필요한 모든 향신료 및 기타 부재료 등은 건국협회의 협조를 얻어 사용하였다. 그 이외의 시약은 생화학 분석용을 구입하여 사용하였다.

2. 단백질 추출

단백질 추출은 Martin 등이 제시한 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 즉, 각 부위별로 채취한 원료육에서 지방, 인대 등을 제거한 시료 3g에 2mM PMSF, 0.02% Na₃N가 함유된 식염수(0.85% NaCl) 12ml를 첨가하여 4℃에서 1분간 24,000 rpm으로 균질(UltraTurrax T25, Germany)한 후 4℃에서 7,500×g로 15분간 원

심분리하여 그 상등액을 채취하여 염용성 단백질로 사용하였다. 수용성 단백질의 추출은 2mM PMSF와 0.02% NaN_3 가 함유된 증류수를 사용하여 위와 동일한 방법으로 실시하였다. 또한, 2mM PMSF와 0.02% NaN_3 가 함유된 0.5% SDS와 0.5% Triton X-100을 사용하여 단백질 농도를 0.25g/ml의 농도로 희석하여, 위와 동일한 방법으로 균질한 후, 실온에서 3시간 교반하여 육단백질을 추출하였다. 축육제품의 경우, 1% SDS를 이용하여 사법과 동일한 방법으로 추출하였으며, 추출한 모든 가용성 단백질은 측정시까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다.

3. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry법을 보완한 Markwell법을 사용하였다. 고농도의 요소나 Triton X-100가 존재할 경우, Peterson의 방법에 의해 단백질을 먼저 침전시키고 그 침전물을 이용하여 Markwell의 방법으로 정량하였다. 표준 물질은 BSA를 사용하였으며, Milton-Roy 601분광고도계를 이용하여 750nm의 흡광도에서 단백질의 양을 정량하였다.

4. SDS-PAGE분석

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법에 의해 실시하였다. Acrylamide와 Bis-acrylamide의 농도 비는 37:1 (W/W)로 하였으며, 분리 겔의 농도는 10% 또는 15%를, 또한 농축 겔은 5%를 사용하였다.

SDS-PAGE에 의한 단백질의 분자량 측정은 표준 분자량maker (myosin; 205 kDa; β -galactosidase, 116 kDa; phosphorylase, 97.4 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa)를 사용하여 15% Acrylamide농도에서 측정하였다. 단백질의 분석량은, 단백질 염색은 $15\mu\text{g}$, 당염색은

30 μ g을 사용하였으며, 전기 영동 후 단백질 염색은 Coomassie brilliant blue R-250 (CB), 당단백질은 과요소산-Schiff시약 (PAS)으로 염색하였다.

5. 내열성 단백질의 조제 및 항체의 생산

원료육 및 계육혼합 축육제품으로부터 상법에 의해 추출한 수용성 단백질을 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 7,500 \times g, 15분간 원심분리하였으며, 분취한 상등액을 항원으로 사용하였다.

New Zealand white Rabbit (2.5kg, 우)의 복강 피하 내에 내열성 계육 단백질을 면역하였으며(2mg/500 μ l, PBS : complete Freund's adjuvant = 1:1), 1차면역 2주일 후, 1차면역과 동일한 양의 항원을 PBS에 녹인 후 incomplete Freund's adjuvant와 1:1로 혼합하여 복강 피하 내에 면역하였다. 1주일 후, 2차 면역과 동일한 방법으로 항원을 주사하였으며, 1주일 후에 혈액을 채취하여 3,000 rpm/10min 원심 분리하여 얻은 항혈청을 사용하여 분석하였다.

6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

PAS-4에 대한 hybridoma cells의 배양액 중에 분비되어 있는 항체의 역가를 조사하기 위하여 ELISA를 실시하였다(Hornbeck, 1992). 10 μ g/100 μ l가 되도록 PBS에 분산시킨 PAS-4를 ELISA용 의 polystyrene plates (96 wells)에 분주한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 plate에 결합시켰다. 이 plates를 0.05% Tween 20을 함유한 PBS-buffer (PBS-Tween용액)를 사용하여 3회 세척한 후, 1% BSA를 사용하여 blocking하였다(1hr/실온). PBS-Tween으로 3회 세척한 후, 1차 항체로써 배양액 100 μ l/well첨가하여 37 $^{\circ}$ C/1.5 hr반응시켰다. PBS-Tween으로 5,000배 희석한 alkaline phosphatase

conjugated anti-mouse IgG를 $100\mu\text{l}/\text{well}$ 첨가하여, $37^{\circ}\text{C}/1.5\text{ hr}$ 반응시켰다. PBS-Tween으로 세척한 후, 1% p-nitrophenyl phosphate disodium salt를 함유한 0.5% diethanol amine 용액(pH 9.7)을 사용하여 반응시킨 후, 405 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

7. Immunoblotting과 Dot blotting

축종별 원료육 및 축육제품을 SDS-PAGE로 분리한 후, Semi-dry blotting장치(Bio-Rad, USA)를 사용하여 PVDF막에 blotting하였다. Blotting한 PVDF막에 1차 항체로서 anti-chicken serum을 넣어 $37^{\circ}\text{C}/1.5\text{ hr}$ 반응시켰다. PBS-Tween을 이용하여 10분 간격으로 3번 세척하였다. PBS-Tween으로 1,000배 희석시킨 HRP-conjugated anti-rabbit IgG를 2차항체로 사용하여 $37^{\circ}\text{C}/1.5\text{ hr}$ 반응시킨 후, 0.01% H_2O_2 와 0.05% diaminobenzidine을 함유한 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)를 기질 용액으로 사용하여 계육 표지 단백질과의 특이성을 검증하였다.

원료육 및 육제품으로부터 추출한 내열성 단백질을 이용하여 Dot blotting를 실시하였다. PVDF막을 넣은 Bio-Dot™ (Bio-Rad사)에 시료를 첨가한 후, 진공펌프를 이용하여 농축하였으며, 1% 젤라틴을 이용하여 실온에서 30분간 Blocking하였다. Blocking한 PVDF막을 Immunoblotting의 방법과 동일하게 항체와 반응시킨 후, 시료중에 함유되어 있는 원료육의 양을 검증하였다. Dot blotting에 의해 Image analyzer (Bio-Propil)를 이용하여 분석하였다.

8. 육제품의 제조

계육, 돈육, 그리고 우육제품의 원료육 및 부재료의 구성 배합비는 표 1과 같다. 조제한 육 혼합물은 천연 양장케이싱에 충전한 후, 55°C 에서 30분간 건조, 60°C 에서 20분간 훈연, 그리고 80°C 에

Table 1. Formula of frankfruter sausage with chicken, Hanwoo and pork meat.

C : B (%) *	C : P (%) *	Formula (%)
100 : 0	100 : 0	Meat : 64
50 : 50	50 : 50	Fat : 18
30 : 70	30 : 70	Ice : 18
10 : 90	10 : 90	NPS : 1.6
5 : 95	5 : 95	Phosphate : 0.25
3 : 97	3 : 97	MSG : 0.05
1 : 99	1 : 99	Sugar : 0.7
0 : 100	0 : 100	

* C, chicken meat; B, Hanwoo meat; P, Pork meat

Table 2. Amounts of meat extracted with distilled water, 0.85% salt, 0.5% sodium dodecyl sulfate or 0.5% Triton X-100 from hind leg (n=3).

	(μg/g protein)			
	Hanwoo ¹⁾	Holstein ¹⁾	Pork ¹⁾	Chicken ¹⁾
Distilled water	11.2±0.6	14.2±0.4	18.3±0.5	19.2±0.2 ²⁾
Salt	13.3±0.8	17.6±0.3	21.2±0.2	26.8±0.3 ²⁾
SDS	36.2±0.6	26.3±0.7	39.3±0.4	37.3±0.5 ²⁾
Triton X-100	25.2±0.4	22.2±0.8	24.9±0.5	27.2±0.2 ²⁾

※ 1) Loin and chuck, 2) breast

서 15분간 가열하는 등의 조건으로 소시지 제품을 만들었다.

제3절. 실험결과 및 고찰

1. 돈육성분의 검증법 개발에 관한 연구

가. 돈육단백질의 추출 및 특이성분의 검색

돈육의 지표단백질을 선택, 실용화하기 위한 조건은 수용성, 염용성, 난용성 단백질중 세포막으로부터 분리 정제가 간편하고, 재현성이 우수하며, 종 특이적으로 발현되는 성분이어야만 한다.

이러한 관점에서, 먼저 수용성 및 염용성 단백질을 비교 분석한 결과, 단백질의 추출량은 생리 식염수를 사용한 경우 그 함량이 다소 증가하였지만(Table 2), 증류수와 유의적인 차이는 없었다. SDS의 경우, 증류수에 비하여 약 2배의 단백질이 추출되었으며, 본 연구에서 사용한 추출용매 중에서는 가장 많은 단백질 용해성을 나타내었다. 각 추출용매에 따른 추출단백질의 구성성분을 SDS-PAGE에 의한 분석한 결과, 추출용매 특이적으로 추출되는 성분은 발견되지 않았다. 따라서 단백질의 생화학적인 특성을 유지하고 현장에서의 활용방안을 고려하였을 때, 돈육중의 수용성단백질을 이용하여 지표 단백질의 검색을 검토하기로 하였다.

각 부위별 수용성 단백질의 추출량을 검사한 결과, 돈육의 경우, 등심이 가장 많은 단백질 추출량을 나타내었으며, 양지부위가 가장 적은 량을 나타내었다(Table 3). 이러한 추출량의 차이는 근육조직을 구성하고 있는 단백질의 함량에 기인하는 것으로 사려되지만, 각 부위별 추출량에는 유의적인 차이가 없었다. 또한 부위별 구성성분을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 각 부위별 구성성분은 거의 동일한 것으로 확인되었으며, 이는 원료육 단백질의 식별을 위하여 사용하는 돈육은 어떠한 부위를 사용하여도 된다는 것을 입

Table 3. Extraction amounts of chicken, pork and Hanwoo meat with distilled water (n=3).

	($\mu\text{g/g}$ protein)			
	Hanwoo	Holstein	Pork	Chicken
Loin and chuck	11.2 \pm 0.6	14.2 \pm 0.4	18.3 \pm 0.5	19.2 \pm 0.2 ¹⁾
Shank	11.2 \pm 0.2	14.2 \pm 0.3	13.3 \pm 0.5	
Rib	9.2 \pm 0.4	15.2 \pm 0.6	15.7 \pm 0.3	17.4 \pm 0.7 ²⁾
Fore leg	11.5 \pm 0.6	14.7 \pm 0.4	15.5 \pm 0.2	
Hind leg	11.2 \pm 0.6	14.2 \pm 0.4	16.8 \pm 0.3	18.8 \pm 0.3 ³⁾

※1)breast, 2) rib, 3) leg

Table 4. Extraction amounts of chicken, pork, and Hanwoo meat by heated by at 75°C to 100°C for 30 min (n=3).

	($\mu\text{g/g}$ protein)			
	Heating Tem. (°C)	Before heating (mg)	After heating (mg)	Recovery (%)
Chicken	75	10	3.33	33.3
	80		2.89	28.9
	90		2.65	26.5
	100		2.25	22.5
Pork	75	10	1.11	11.1
	80		1.08	10.8
	90		0.95	9.5
	100		0.86	8.6
Hanwoo	75	10	3.47	34.7
	80		2.87	28.7
	90		2.36	23.6
	100		1.69	16.9

증한 좋은 결과라 생각한다.

돈육 특이적으로 발현되는 지표단백질을 밝히기 위하여 Fig.1에서와 같이 증류수로 추출한 우육, 돈육, 계육의 수용성 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 분자량 약 32kDa 및 55kDa의 성분이 돈육에 있어서 종 특이적으로 발현되고 있는 것이 발견되었다. 따라서 특이항체 생산을 위하여 수용성 단백질을 항원으로 이용하였으며, 이후 현장에 적용할 경우 유리되어 나온 육즙을 그대로 사용할 수 있다는 가능성을 보여준 결과라 평가된다.

나. 내열성 단백질에 대한 항체의 생산

수용성 단백질을 비가열 및 75°C에서 30분간 가열처리 한 후, 이것을 이용하여 총 4회에 걸쳐 면역을 실시하여 복합항체를 생산하였다. 4회에 걸쳐 얻어진 항혈청의 역가를 조사한 결과, 거의 직선적으로 그 역가가 증가하고 있는 것으로 확인되었다. 일반적으로 가열상태의 축종별 원료육의 식별은 거의 불가능하며, 이를 식별하기 위한 System의 확립이 매우 중요한 것으로 평가되고 있다. 따라서 본 연구에서는 가열 육가공품의 검증을 위하여 가열 돈육에 대한 항혈청을 이용하여 연구를 진행하기로 하였다.

다. Indirect ELISA (iELISA)에 의한 돈육의 검증

비가열 및 가열(75°C/15분) 수용성 돈육단백질 100 μ g/ml를 100 μ l/well로 coating한 후, 생산된 항혈청을 각각 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000으로 희석하여 그 역가를 ELISA 검사법(Screening法)을 실시하여 측정한 결과, 1:32,000으로 희석한 항혈청의 경우, O.D 405nm에서 가열돈육 0.2이상, 비가열 돈육 0.07을 나타내었다(Fig. 2). 본 연구에 의해 생산된 돈육 특이적인 항체는 역가가 매우 높으며, 비가열 돈육에 비하여 가열

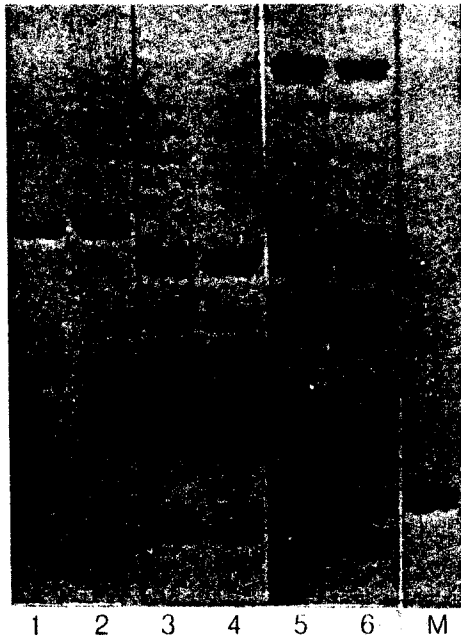
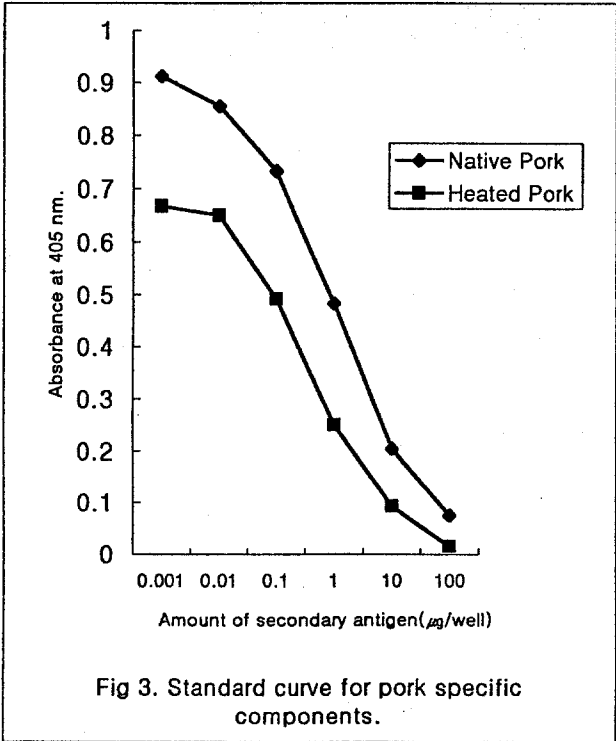
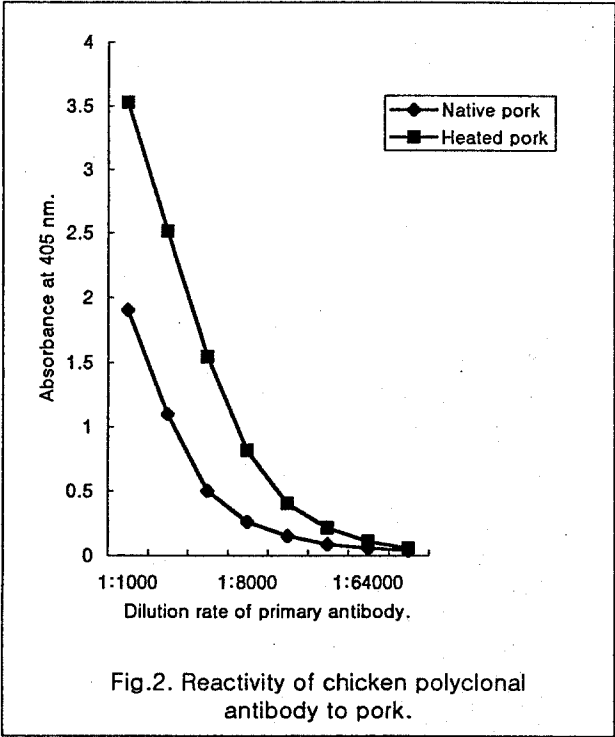


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of chicken pork and Hanwoo meats.
Meats extracted with distilled water in the hind leg(Hanwoo and pork) and leg (chicken). Lanes 1 and 2, chicken: 3 and 4, pork: 5 and 6, Hanwoo. molecular weight of chicken specific components were indicated in left lane.



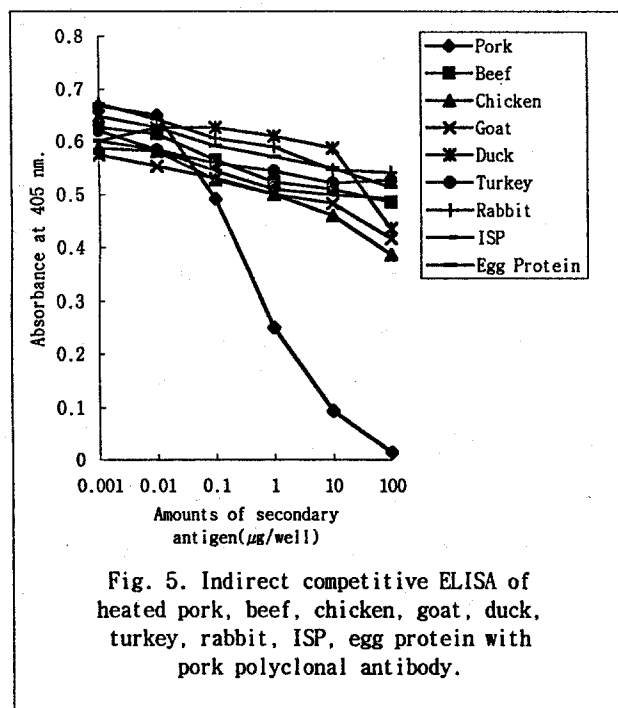
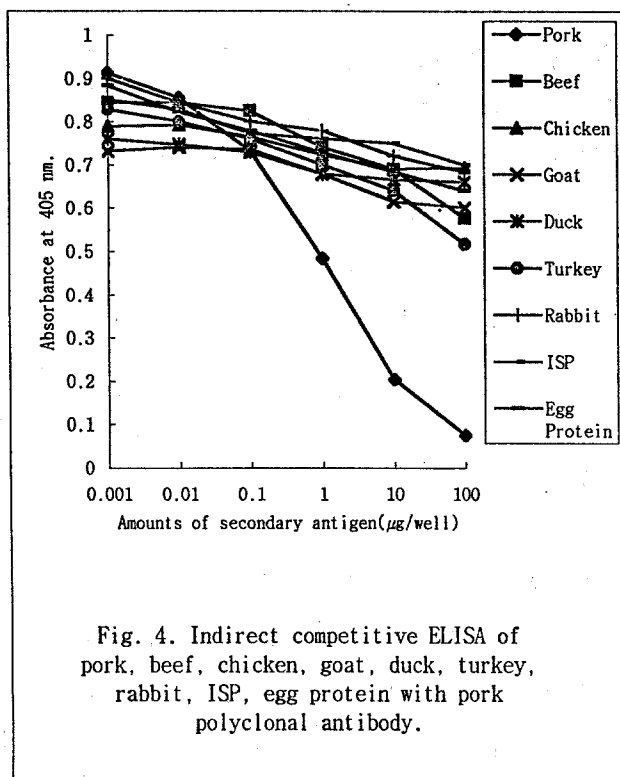
돈육의 역가가 높게 나타나는 것은 가열 돈육에 대한 항체를 이용하였기 때문이라 사려된다.

가열온도에 따른 축종별 육단백질의 내열성을 조사한 결과, 가열온도가 상승함에 따라 분석에 이용한 모든 단백질은 열 변성이 상승하고 있는 것으로 확인되었다(Table 4). 돈육의 경우, 우육 및 계육과 비교할 때 열에 가장 약한 것으로 나타났으며, 75℃에서 계육 및 우육의 약 3배이상 열 변성되는 것으로 나타났다. 또한 100℃로 가열할 경우, 약 91%의 육 단백질이 열 변성되는 것이 확인되었다.

라. ciELISA에 의한 돈육의 검증

ciELISA에 의한 비가열 및 가열 돈육의 표준곡선을 작성한 결과, 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ 이상에서 거의 직선적인 경향을 나타내어, 본 연구에서 생산한 항체의 검출감도는 10ng인 것이 확인되었다(Fig. 3). 검출감도로 볼 때 비교적 낮은 수준이나, 그 경합의 양상이 농도의존성이 매우 강하여 원료육 단백질의 혼합물은 물론이고 축육제품중의 돈육의 검증을 위하여 매우 유효 적절하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

비가열 돈육 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 이 되도록 분주하여, 실온에서 2시간 결합시킨 후, ciELISA를 실시하였다. 돈육과의 경합반응에서 0.01 $\mu\text{l}/\text{well}$ 에서 경합이 시작되었으며, 그 이상의 농도에서 직선적으로 역가가 감소하고 있는 것이 확인되어, 본 연구에 의해 만들어진 돈육 복합항체는 돈육과 특이적으로 결합하고 있는 항체임이 입증되었다(Fig. 4). 그러나, 우육, 계육, 염소육, 칠면조육, 오리육, 토끼육, ISP, 그리고 계란단백질과는 전혀 경합이 발생하지 않는 것이 확인되었다. 따라서 일반적으로 복합항체를 이용할 경우 발생하는 교차반응은 ciELISA에 의해 모두 제거되었으



며, 이 ciELISA계를 실시할 경우, 원료육 중에 혼입되어 있는 돈육의 량을 검출할 수 있음이 입증되었다(Fig. 4). 가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, iELISA의 결과와 달리 비가열육의 역가보다 낮은 흡광도를 나타내었으나, 가열돈육의 경합이 더 우수한 것으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 ciELISA에 의해 육혼합물 중의 돈육을 검증할 수 있다는 것이 확인되었으며, 시중에 유통되고 있는 축육제품중의 돈육의 함량은 물론이고 이종단백질의 혼입 정도도 판별할 수 있는 실험계를 확립할 수 있게 되었다. 이러한 결과를 토대로 실용화 System구축을 위한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사려된다.

2. 계육성분의 검증법 개발에 관한 연구

가. 단백질 추출법의 정립

증류수, 0.85% NaCl, 0.5% SDS, 그리고 0.5% Triton X-100을 이용하여 축종별 추출량을 비교 분석하였다. 증류수를 이용하여 가슴육을 추출한 결과, 가슴부위 19.2, 갈비부위 17.4, 다리부위 18.8 μ g/g protein이 추출되었다(Table 3). 0.85% NaCl에 의한 추출조건에서는 증류수와 거의 같은 량의 단백질(26.8 μ g)이 추출되었으나 SDS 및 Triton X-100에 의해서는 1.5배 이상의 추출량을 나타내었으며, 특히 0.5% SDS에 의한 추출조건에서 가장 많은 단백질이 유리되었다(Table 2). 한우육의 경우도 이와 유사한 경향을 나타내었으나, 0.5% SDS에 의한 추출에서는 증류수의 약 3배 이상의 단백질(11.2 μ g \rightarrow 36.2 μ g)이 추출되었다(Table 2).

각 추출조건에 따라 유리된 단백질의 구성성분을 SDS-PAGE에 의하여 분석한 결과, 단백질의 추출량에는 차이가 있었으나 그 구성 성분에는 큰 차이가 없는 것이 확인되었다(Fig. 6). 또한 고 분자량이 다소 많이 추출된 것이 확인되었으며, 이 성분은 myosin으로

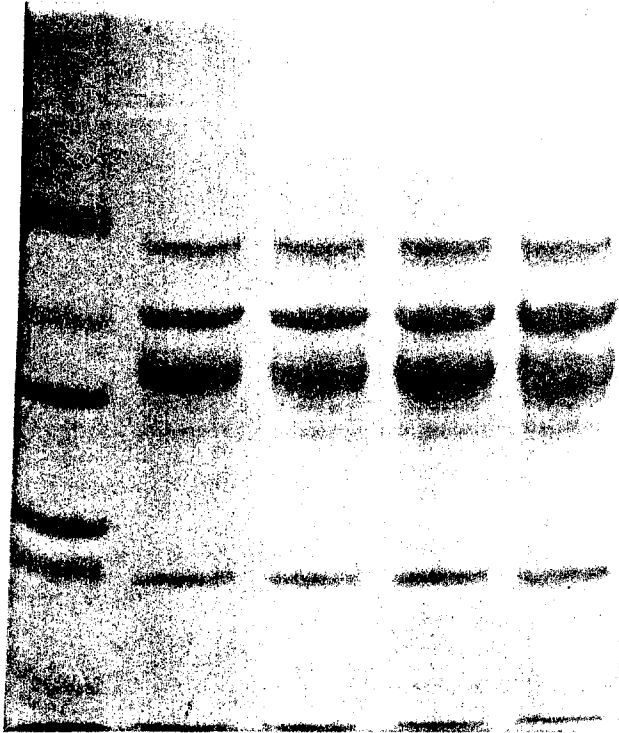


Fig. 6. SDS-PAGE patterns of chicken meat extracted with various extraction solutions.

Meat were mixed with solubilization solution (3g/12ml) and homogenized with ultraturax at 24,000 rpm for 1 min. Extracted proteins separated with centrifuging 15,000 rpm for 15 min. Charged protein amounts were 20 μ g, and gel was stained with CB. Lanes 1, molecular weight makers; 2, distilled water; 3, 0.85% saline solution; 4, 0.5% SDS; 5, 0.5% Triton X-100.

생각되며, 그 이외의 새로운 특이적 성분은 추출되지 않았다. 따라서 원료육 처리의 단순성과 육즙을 이용할 수 있다는 이점에서 이후의 연구에서는 증류수로 추출한 시료를 이용하여 본 연구를 진행하기로 하였다.

나. 각 부위별 구성 단백질의 분석

SDS-PAGE를 이용하여 추출한 각 부위별 15 μ g씩 SDS-PAGE에 의해 분석한 결과, 부위별 특이적인 성분이 검출되지 않았으며, 유의성을 발견할 수 없었다(Fig. 7). 이는 CB염색에 의해 검출 가능한 단백질 차원에서의 각 부위별 구성성분에는 큰 차이가 없는 것을 나타내고 있는 것이며, SDS-PAGE에 의해 축종 식별을 모색할 경우, 부위별 구분 없이 계육의 육단백질, 또는 Drip을 이용할 수 있음을 시사하는 것이라고 사려된다.

다. 계육 특이적 성분의 검색

증류수를 이용하여 계육, 한우육, 홀스타인육, 그리고 돈육을 처리하여 회수한 가용성 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. SDS-PAGE의 CB염색 패턴을 비교한 결과, 계육은 우육 및 돈육의 구성 단백질의 성분과는 매우 다르게 나타나 있으며, 이는 계통학적인 근거에서도 매우 타당성 있는 결과라고 사려된다. 계육은 분자량 약 50 kDa과 38 kDa의 성분이 특이적으로 검출되었으며(Fig. 1, lanes 1과 2). 또한 58 kDa 및 42 kDa성분은 미량으로 검출되었으나, 다른 축육과 비교할 때 특이적인 성분으로 확인되었다.

라. 50 kDa 성분의 정제

SDS-PAGE를 이용하여 증류수로 추출한 계육을 분리한 후, 겔로

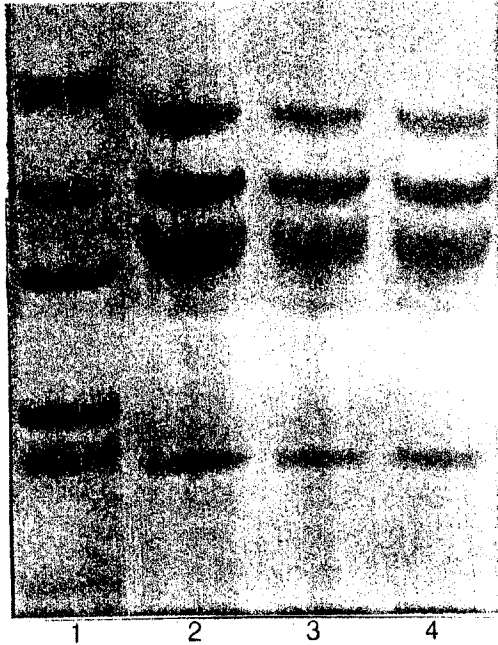


Fig. 7. SDS-PAGE patterns of part meats from chicken meat.
Meat extracted with distilled water and separated With 12% polycrylamide. Lane 1,
molecular weight makers: 2, breast: 3, rib: 4, leg.

부터 50 kDa성분의 정제를 검토하였다(Fig. 8). SDS를 함유한 9% polyacrylamide겔을 이용하여 15 mA/1.5시간 전기영동한 후, 2.5% CB를 이용하여 5분간 염색하고 10% 에탄올로 탈색하였다. 특이성분의 Band를 분리하여 0.1% SDS용액을 이용하여 투석한 후, SDS 용액에 유리된 단백질을 회수한 결과, 약 80%의 회수량을 나타내었다. 약 70-90%의 회수가 가능하다는 지금까지 보고와 거의 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 겔로부터 정제한 계육 특이적인 성분을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 전기영동에 의하여 단일 성분으로 정제된 것을 확인 할 수 있었으며(Fig. 9, lane 2), 이를 면역원으로 사용할 수 있는 것이 확인되었다. 또한 다른 계육의 성분들도 50 kDa성분의 경우와 동일한 방법으로 정제한 결과, SDS-PAGE에 의해 단일성분으로 검출되었다(Fig. 9). 계육의 수용성 확분으로부터 SDS-PAGE분석에 의하여 정제된 50 kDa단백질의 량을 계산한 결과 약 81.5% 회수되어(Table 5), SDS-PAGE에 의하여 계육 특이적인 성분을 대량으로 정제할 수 있는 정제법을 확립할 수 있게 되었다. 따라서 본 연구과제에서 확립한 SDS-PAGE에 의한 정제법을 이용함으로써 막대한 시간과 예산이 필요한 단백질 정제를 간단하고 신속하게 수행할 수 있게 되어, 단백질에 대한 연구는 물론이고 단일 항체 생산에 필요한 항원의 조제방법으로 크게 이용될 수 있으리라 사려된다. 또한 peptide의 생화학적 특성을 연구하기 위한 정제법으로 크게 기여할 것으로 생각한다.

계육을 SDS-PAGE로 분석한 후, CB염색하여 LKB2202 Ultra Scan을 사용하여 증류수에 의하여 추출된 계육의 구성 단백질 중 50 kDa 성분의 함량을 측정하였다. 그 결과 전체 단백질 중의 약 12.3%를 차지하고 있었다(Fig. 10, lane 2 and 4).

마. 가열온도에 따른 내열성 단백질의 검색



Fig. 9. SDS-PAGE patterns of the fractions purified with electrophoretic elution of chicken meat specific components.

Lanes 1 to 5, purified protein of chicken meat: 6, chicken meat: 7, molecular weight markers. Gels were stained with CB. Charged protein amounts were $5\mu\text{g}$ for lanes 1 to 5 and $20\mu\text{g}$ for 6 and 7. Chicken meat specific components were lane 2 (50kDa) and 3 (38 kDa).

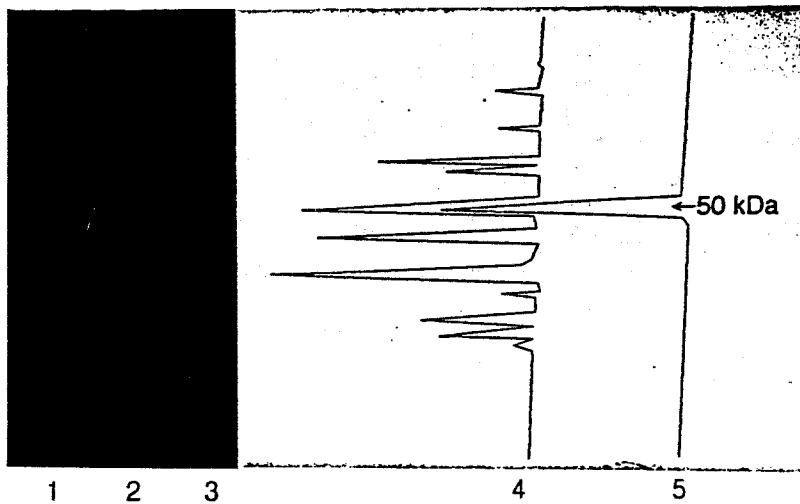


Fig. 10. SDS-PAGE pattern and the scanning profiles of chicken meat and purified 50 kDa.

Lanes 1, molecular weight markers from the top and to the bottom: myosin heavy chain (205 kDa), b-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa): 2, chicken meat: 3, purified 50 kDa: 4 and 5 shows scanning profiles of lanes 1 and 2.

Table 5. Summary for purification of 50 kDa component from chicken meat.

Purification step	Total protein (mg)	Purity (%)	50kDa (mg)	Yields (%)
Chicken meat	13.0(g)			
Water soluble fraction	42.5	12.3	5.2	0.04
SDS-PAGE	1.5	12.3	0.18	
50kDa		100	0.15	81.5

Table 6. Extraction amounts of partial chicken, pork and Hanwoo meat by heated at 75°C for 30 min.

($\mu\text{g/g}$ protein)

	Part	Before heating(mg)	After heating(mg)	Recovery(%)
Chicken	Breast	10	3.33	333.3
	Rib		2.49	24.9
	Leg		3.29	32.9
Pork	Shank	10	1.11	11.1
	Rib		1.78	17.8
	Hind leg		2.31	23.1
Hanwoo	Shank	10	3.47	34.7
	Rib		3.25	32.5
	Hind leg		3.59	35.9

육 가공품 중에 함유되어 있는 계육의 함량을 측정하기 위하여 먼저 계육, 우육, 돈육을 각각 75, 80, 100°C로 가열한 후, 내열성 성분의 조성을 검토하였다. 그 결과 모든 육은 가열온도가 상승함에 따라 그 변성도가 큰 것으로 나타났으며(Table 4), 온도에 따라 특이적인 내열성 성분이 존재하는 것이 확인되었다(Fig. 11). 계육의 경우, 68kDa성분이 내열성 성분으로 확인되었으며, 미량의 50kDa성분도 잔존하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 11, lanes 5, 8, 11). 돈육 및 우육의 경우, 80, 47, 그리고 41kDa성분이 내열성 성분으로 확인되었으나, 100°C에서는 거의 열 변성하여 침전한 것으로 확인되었다(Fig. 11). 각 가열온도에 따른 열 변성된 단백질의 양을 측정한 결과 약 70~90%의 단백질이 열 변성된 침전한 것으로 확인되었다(Table 4).

75°C에서 30분간 가열한 후 부위별 열 변성하다 단백질의 양을 비교한 결과, 계육은 가슴살 및 다리근육, 우육 및 돈육은 후지부위의 성분이 열에 가장 강한 것으로 확인되었다(Table 4). 또한 계육, 우육, 그리고 돈육에 관계없이 운동량이 가장 많은 부위가 내열성 단백질이 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 축종에 따른 열 변성정도를 비교한 결과, 계육이 가장 적은 변성도를 나타내었으며, 돈육, 그리고 우육의 순으로 열에 강하였다(Table 4).

바. Immunoblotting에 의한 계육의 검색

50kDa에 대한 이 항혈청의 특이성을 검사하기 위하여 Immunoblotting을 실시한 결과, 50kDa성분과 특이적으로 반응하고 있는 것이 확인되었다(Fig. 12, lane 1과 10). 이는 항원으로 사용한 50kDa성분이 단일 성분이었기 때문에 사려되며, 면역에 사용하는 항원의 정제도에 의하여 복합항체의 특이성이 결정된다는 것이 시사되었다. 따라서 본 연구진에 의해 확립된 정제법은 특정

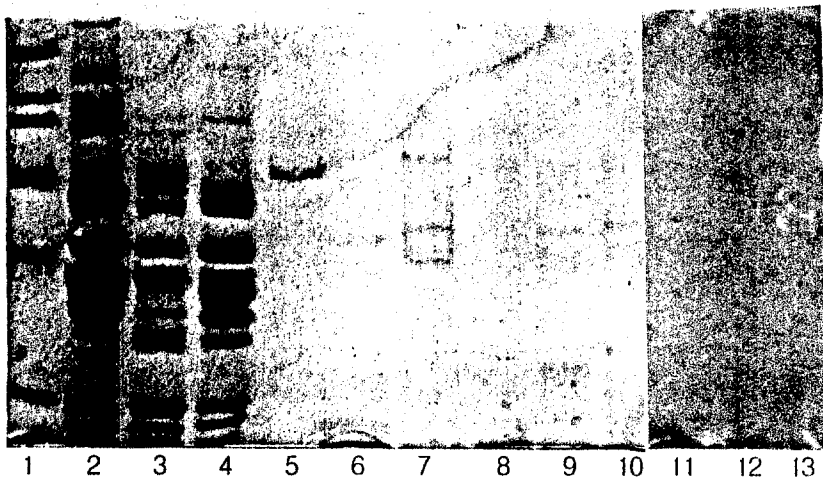


Fig. 11. SDS-PAGE of heated chicken, pork and Hanwoo meat on the various heating condition(75 to 100°C).

Meat samples were heated at 75°C(lanes 5, 6, 7), 80°C(lanes 8,9,10) and 100°C(11, 12, 13). Charged protein amounts were 15 μ g.

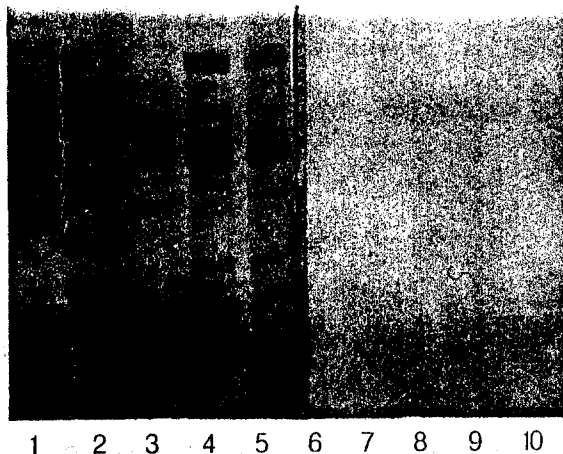


Fig. 12. SDS-PAGE and immunoblotting with anti-serum raised to 50 kDa.

Meat samples were analyzed by SDS-PAGE(12%) under reducing conditions and lanes 1 to 5 were stained with CB and 6 to 10 were immunoblotted. Lanes 1 and 10, chicken meat; lanes 2 to 9, mixed with chicken and Hanwoo (2 and 9), pork (3 and 8), ISP (4 and 7), Hanwoo, pork and ISP mixtures (5 and 6). Charged protein amounts were 10 μ g.

성분에 대한 특이항체를 생산하기 위한 면역원의 생산을 위하여 매우 유효 적절한 방법이라 사려된다.

이 항혈청을 이용하여 계육과 한우육, 돈육, 그리고 ISP와의 혼합물(1 : 1) 및 한우육, 돈육, 그리고 ISP의 혼합물을 이용하여 Immunoblotting을 실시한 결과, 계육만을 이용한 것보다 낮은 감도를 나타내었으며(Fig. 12, lanes 2 to 4 and 7 to 9), 계육을 포함하지 않은 시료와는 전혀 반응하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 이 항혈청을 이용하여 육 혼합물에 혼입되어 있는 계육의 검증이 가능하다는 것이 시사되었다.

계육, 한우육, 돈육, 그리고 ISP를 70℃에서 30분간 가열한 후, 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 열 변성된 성분을 제거하였다. 그후, 내열성 성분을 비 가열 항원을 이용한 Immunoblotting과 동일한 방법으로 분석한 결과, 50kDa성분으로 판단되는 성분만이 항혈청과 반응하였다(Fig. 13, lane 1과 10). 또한 가열 계육과 가열한 한우육, 돈육, 그리고 ISP와의 혼합물(1 : 1) 및 가열한 한우육, 돈육, 그리고 ISP의 혼합물을 이용하여 Immunoblotting를 실시한 결과, 가열 계육만을 이용한 것보다 낮은 감도를 나타내었으며, 가열 계육을 포함하지 않은 시료와는 전혀 반응하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 13, lanes 2 to 4 and 7 to 9).

사. ELISA에 의한 계육의 검증법 확립

비가열 및 가열(75℃/15분) 수용성 계육단백질 100 μ g/ml를 100 μ l/well로 coating한후, 생산된 항혈청을 각각 1:1,000 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000으로 희석하여 그 역가를 ELISA검사법(Screening法)을 실시하여 측정한 결과, 1:32,000으로 희석한 항 혈청의 경우, O.D 405nm에서 비가열 및 가열계육의 역

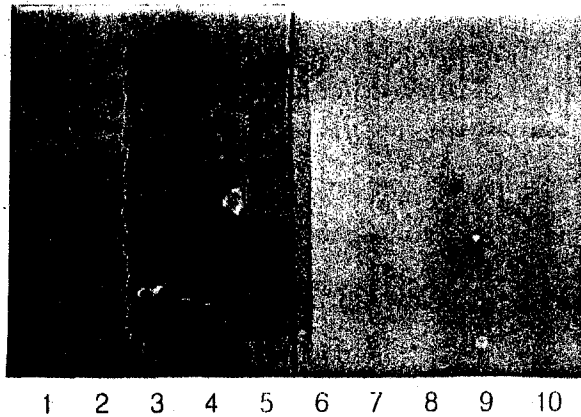


Fig. 13. SDS-PAGE of heated proteins extracted from various meat preparations and immunoblotting with anti-serum.

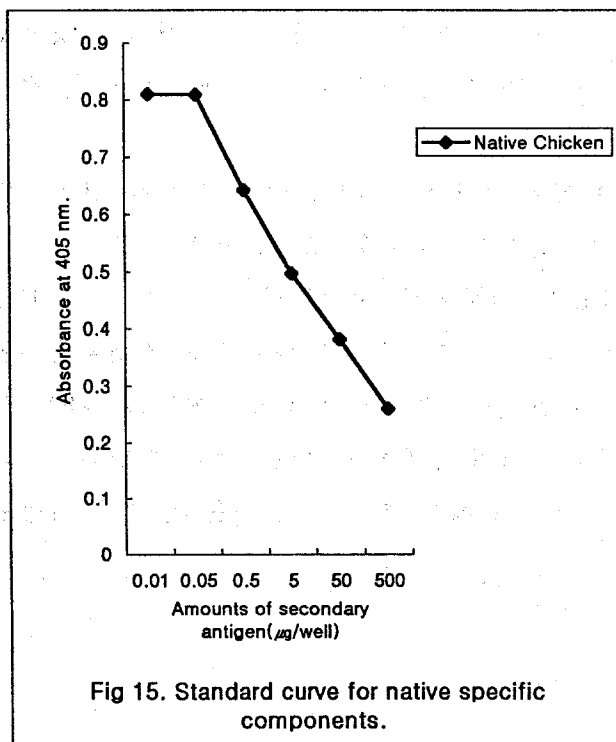
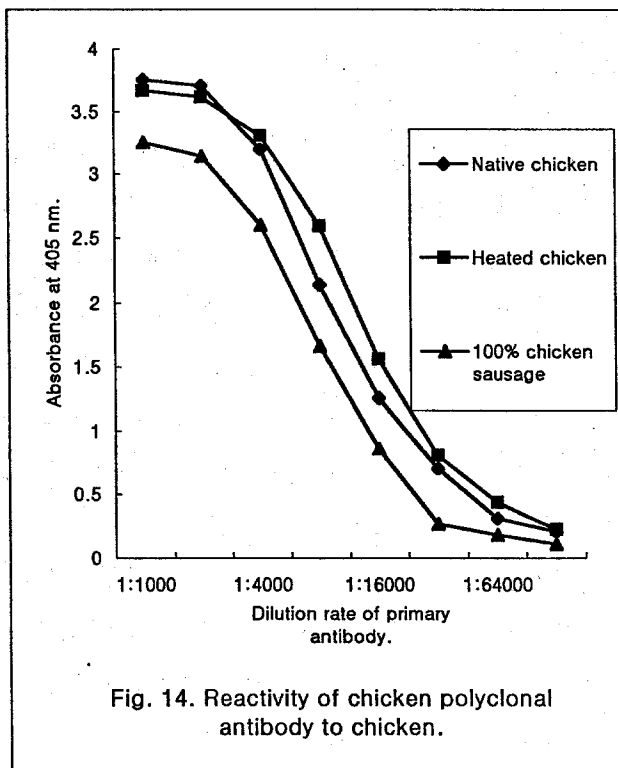
Meat samples were analyzed by SDS-PAGE(12%) under reducing conditions and lanes 1 to 5 were stained with CB and 6 to 10 were immunoblotted. Lanes 1 and 10, chicken meat; lanes 2 to 9, mixed with chicken and Hanwoo (2 and 9), pork (3 and 8), ISP (4 and 7), Hanwoo, pork and ISP mixtures (5 and 6). Charged protein amounts were $10\mu\text{g}$.

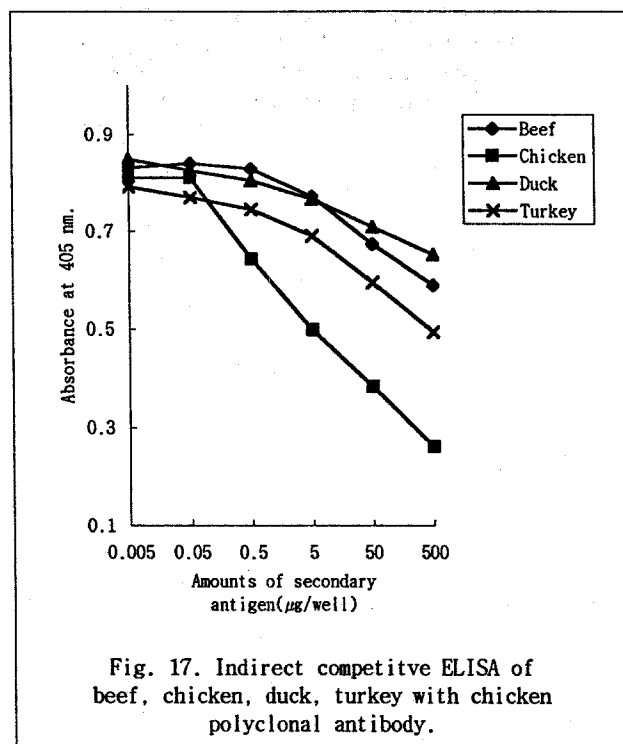
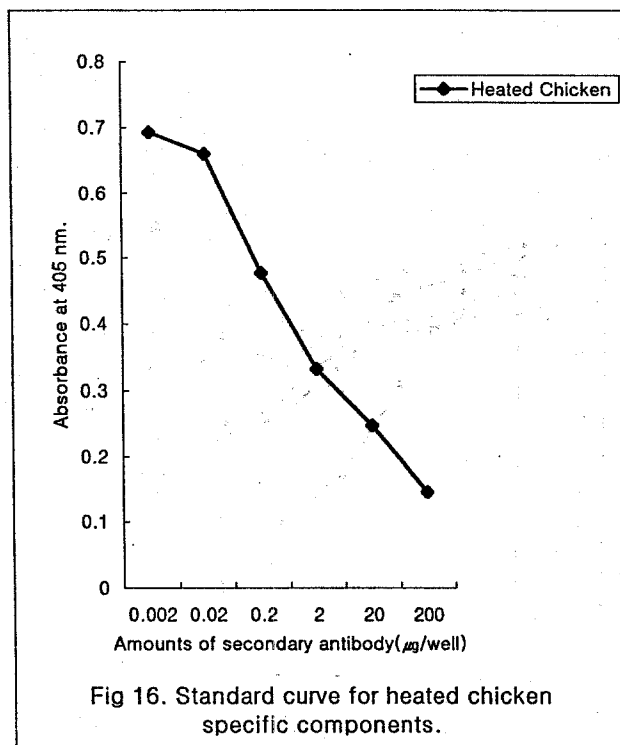
가가 0.6이상을 나타내었다(Fig. 14).

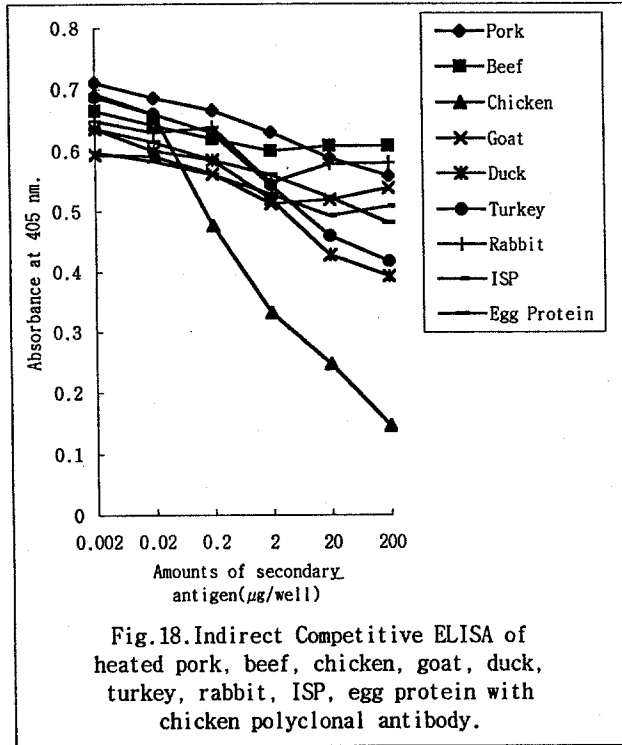
ciELISA에 의한 비가열 및 가열 계육의 표준곡선을 작성한 결과, 비가열 계육의 경우 $0.05\mu\text{g}/\text{well}$ 이상에서 거의 직선적인 경향을 나타내어, 본 연구에서 생산한 항체의 검출감도는 50ng 인 것이 확인되었다(Fig. 15). 가열 계육의 경우도 비가열 계육의 경합양상과 거의 유사한 경향을 나타내었으며(Fig. 16), 검출한계는 비가열 계육보다 다소 높은 20ng 이었다. 검출감도로 볼 때 비교적 낮은 수준이나, 그 경합의 양상이 농도의존성이 매우 강하여 원료육 단백질의 혼합물은 물론이고 축육제품중의 계육의 검증을 위하여 매우 유효적절하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

비가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, $0.05\mu\text{g}/\text{well}$ 의 계육 함량에서부터 강한 경합반응을 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 거의 직선적으로 경합반응이 일어나고 있는 것이 확인되었다(Fig. 17). 그러나 돈육, 오리육, 그리고 칠면조 육에서는 거의 경합이 일어나지 않는 것이 확인되었으나, 우육의 경우, $500\mu\text{g}/\text{well}$ 이상에서 약 50%의 경합이 일어나는 것으로 나타났으나, 이는 계육의 10^{-4} 의 감도로써 큰 문제점은 없을 것으로 사려된다.

가열 육 단백질을 이용하여 ciELISA를 실시한 결과, 비가열 계육보다 강한 경합반응을 나타내었으며, 이는 항원으로 가열 계육 성분을 사용하였기 때문이라 사려된다(Fig. 2-13). 또한 비가열 우육과 반응한 계육 복합항체는 그 항원으로 가열육을 사용함으로써 교차반응이 거의 없는 것으로 나타났으며(Fig. 18), 그 이외의 이종 단백질들과는 거의 반응하지 않는 것이 확인되어, 계육 복합항체를 이용한 ciELISA에서 계육의 검증은 충분히 가능할 것으로 사려된다.







아. Dot-blotting에 의한 계육의 측정

계육 복합항체를 이용하여 Dot blotting을 실시한 결과, 계육의 검출한계는 $1\mu\text{g}/\text{well}$ 이었으며(Fig. 19, lane A, 7), 이러한 검출강도는 계육의 함량에 대하여 의존적이었다(Fig. 19, lanes A). 그러나, 이러한 검출감도는 ELISA에 비하여 매우 낮은 것이지만, 분석의 간편성 및 정성적 분석을 추구할 경우 충분한 검출감도라 사려되어, 시중 육제품 및 제조한 소시지를 이용하여 그 타당성을 검토하였다.

일반적으로 계육을 이용한 육제품의 경우, 혼입되는 단백질원은 우육, 돈육, 또는 ISP인 관계로, 이러한 단백질과 복합항체와의 교차반응을 검사하였다. 그 결과, 계육 복합항체는 계육 이외의 이종단백질과의 비특이적인 결합은 없는 것으로 확인되었다(Fig. 19, lanes B to D).

시중에 판매되고 있는 비엔나소시지(돈육 90.14%), 불고기햄(계육 28.89%, 칠면조 31.44%), 그리고 캔터키프랑크소시지(계육 46.52%, 돈육 24.92%)를 구입하여 수용성 단백질을 추출한 후, 100°C 에서 30분간 가열하였다. 분획한 내열성 단백질을 이용하여 Dot blotting을 실시한 결과, $1\mu\text{g}/\text{well}$ 까지 검출되었으며, 계육의 양이 가장 많이 함유되어 있는 캔터키프랑크소시지가 불고기 햄보다 강하게 염색되었다(Fig. 20, lanes F and G, Fig. 21, lanes B and C). 그러나 계육을 함유하지 않은 비엔나소시지는 계육 복합항체와 반응하지 않는 것이 확인되어(Fig. 19, lane A, Fig. 20, lane A), 본 연구에서 생산한 항체를 이용하면 시중 육제품중에 함유되어 있는 계육을 충분히 검증할 수 있으리라 사려된다.

계육의 함량을 다르게 하여 제조한 육제품(Table 1)을 이용하여 Dot blotting을 실시한 결과, 100% 계육 혼합소시지의 경우, 농도 의존적으로 그 반응성이 강하게 나타났으며, 검출 한계는 $1\mu\text{g}$

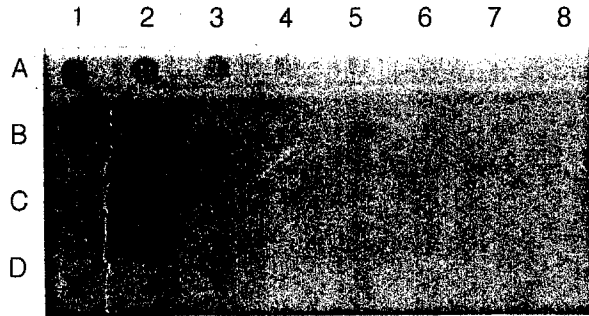


Fig. 19. Dot blotting patterns of antigen-antibody reaction with chicken polyclonal antibody.

Lanes A, chicken meat; B, isolated soy-protein (ISP); C, pork meat; D, Hanwoo meat. Charged amounts was $10\mu\text{g}$, $8\mu\text{g}$, $6\mu\text{g}$, $4\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $0.8\mu\text{g}$, $0.6\mu\text{g}$ and $0.4\mu\text{g}$ per well from 1 to 8. Antigens were heated at 100°C for 30min.

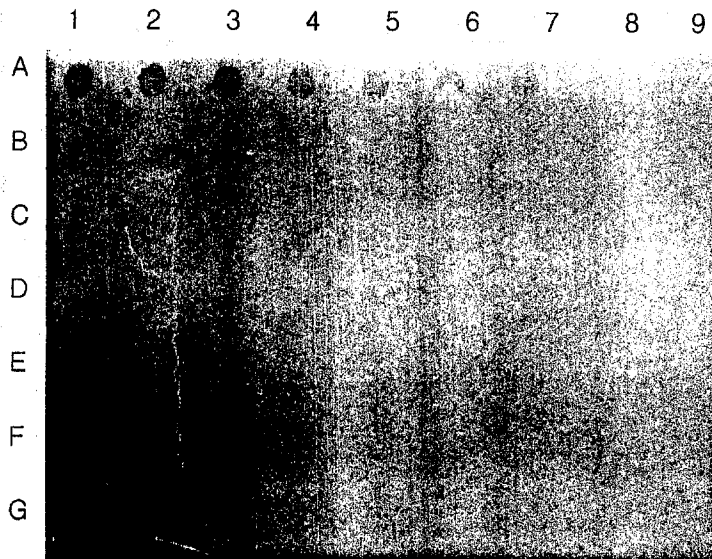


Fig. 20. Dot blotting patterns of various meat products with chicken polyclonal antibody.

Lanes A, chicken meat; B, isolated soy-protein (ISP); C, pork meat; D, Hanwoo meat.; E, viena sausage; F, bulgogi ham; G, frankfruter sausage. Charged amounts were $100\mu\text{g}$, 50, $10\mu\text{g}$, $8\mu\text{g}$, $4\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $0.8\mu\text{g}$ and $0.6\mu\text{g}$ per well from 1 to 9. Antigens were re-heated at 100°C for 30min.

/well)이었다(Fig. 21. lane D). 또한 계육을 함유한 우육 또는 돈육제품의 경우, 계육의 함량에 의존하여 반응하였다(Fig. 20. lane E and F). 따라서 시중에 유통되고 있는 소시지 중 계육이 혼입되어 있을 경우, 본 연구진에 의해 만들어진 항체를 이용하여 충분히 검출할 수 있을 것으로 사려된다. 또한, 본 연구를 위해 제조한 계육 혼합소시지를 이용하여 그 표준 염색 농도 표를 작성할 경우, 현장에서의 응용도 충분히 가능하리라 생각한다.

Dot blotting은 1회에 분석할 수 있는 시료의 수량이 ELISA의 분석량과 동일하며, 농도가 희박한 시료라 하더라도 농축이 용이하다. 또한 본 연구진에 의해 밝혀진 바와 같이, 정성적인 분석에는 매우 적합한 방법이며, 또한 생산한 계육 복합항체가 매우 특이적이기 때문에 표준 농도 표에 의한 계육의 함량측정의 가능성도 높으리라 사려된다.

3. 우육성분의 검증법 개발에 관한 연구

가. 단백질 추출 및 SDS-PAGE에 의한 우육 구성 단백질의 분석

단백질 추출 조건을 검증하기 위하여 축종별 등심부위와 가슴살(계육)을 증류수, 0.85%식염수, 0.5% SDS, 그리고 0.5% Triton X-100을 사용하여 단백질을 추출하였다. 증류수 및 식염수를 이용하여 추출한 경우, 한우육에서보다 홀스타인육에서 더 많은 단백질이 추출되었다. (Table 2). 그러나, SDS 및 Triton X-100을 사용했을 때, 홀스타인육에서보다 한우육에서 단백질이 더욱 더 많이 추출되었다. 특히 세포막 단백질을 추출할 때 일반적으로 많이 이용되고 되고 있는 SDS에 의해 추출된 단백질량은 증류수에 의해 추출된 량과 비교할 때, 한우육에서는 약 3배, 그리고 홀스타인육에서는 약 1.5배 증가된 단백질 추출량을 나타내었으며, 다른 추출 용액과 비교하였을 때도 가장 많은 단백질 추출량을 나타

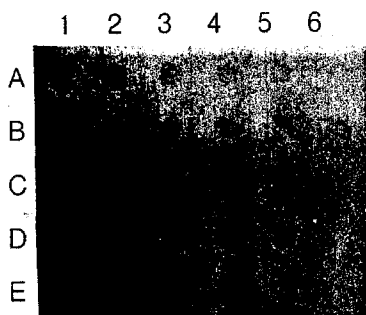


Fig. 21. Dot blotting patterns of various meat products with chicken polyclonal antibody.

Lanes A, chicken sausage; B, chicken and beef mixing sausage; C, chicken and pork mixing sausage; D, beef sausage.; E, pork sausage. Charged amounts were $30\mu\text{g}$, 10 , $5\mu\text{g}$, $3\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$ and $1\mu\text{g}$ per well from 1 to 6. Antigens were re-heated at 100°C for 30min.

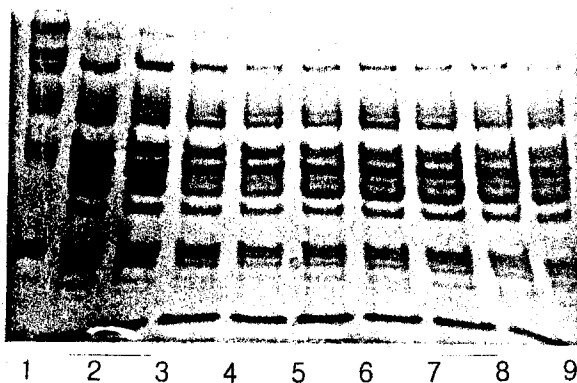


Fig. 22. SDS-PAGE patterns of Hanwoo or Holstein beef extracted with various solution.

Charged protein amounts were $20\mu\text{g}/\text{well}$. Gel was stained with CB.

Lanes 1, molecular weight markers; 2, 4, 6 and 8, Hanwoo; 3, 5, 7 and 9, Holstein; 2 and 3 distilled water; 4 and 5, 0.5% SDS; 6 and 7, 0.5% Triton X-100; 8 and 9, 0.85% saline solution.

내었다(Table 2). 돈육 및 계육의 경우도 이와 유사한 경향을 나타내었으나, Salt에 의한 추출량은 한우 및 홀스타인 육보다 많았다.

SDS-PAGE를 이용하여 추출한 단백질을 분석한 결과 각 추출용액에 따른 한우 및 홀스타인의 구성 단백질 조성에는 큰 차이가 없었으나(Fig. 22), 증류수로 추출하였을 때 보다 식염수, SDS 및 Triton X-100으로 추출한 경우 고분자의 단백질이 많이 추출되었으며, 이는 분자량으로 볼 때 Myosin을 비롯한 근원섬유 단백질이 다소 많이 추출된 것으로 사려된다.

추출 조건에 따라 한우육과 홀스타인육을 구별할 수 있는 특이성분이 검출되지 않았으므로(Fig. 22), 증류수를 사용하여 축종별 단백질 추출 및 그 구성 단백질의 분석을 실시하였다. 증류수에 의한 부위별 단백질 추출량을 비교한 결과, 한우의 경우 갈비부위가 9.8mg으로써 가장 적은 양을 나타내었으나 그 이외의 부위는 거의 같았다(Table 3). 홀스타인육에서는 각 부위별 단백질의 추출량은 거의 같았으며, 돈육과 계육에서는 각각 등심 및 가슴살에서 가장 많은 단백질 추출량을 나타내었으나, 전체적으로 부위별 단백질의 추출량에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 3).

SDS-PAGE에 의하여 증류수로 추출한 한우육의 각 부위를 분석한 결과, 각 부위별 구성 단백질에는 큰 차이가 없는 것이 확인되었다(Fig. 23). 또한 Fig. 22의 결과와 같이 SDS-PAGE에 의한 각 부위별 구성 단백질을 분석 할 경우, 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 원료육 단백질의 구성성분을 이용하여 축종판별을 실시할 경우, 단백질의 추출 조건은 크게 고려하지 않아도 될 것으로 사려된다.

나. 우육 특이성분의 검색 및 정제

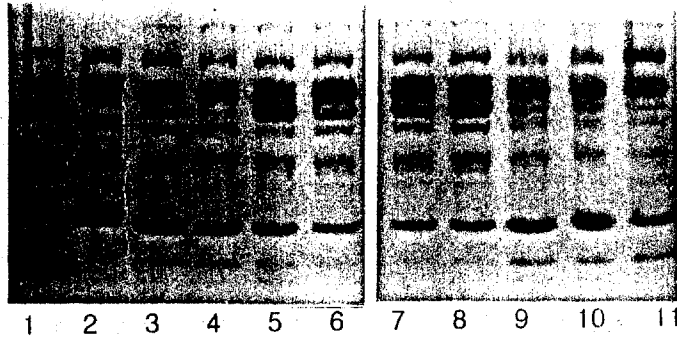


Fig. 23. SDS-PAGE patterns of part meats from Hanwoo and Holstein.

Panels A and B were shown Hanwoo and Holstein. Lanes 1 and 7, loin and chuck; 2 and 8, shank; 3 and 9, rib; 4 and 10, fore leg; 5 and 11, hind leg. Gel was stained with CB.

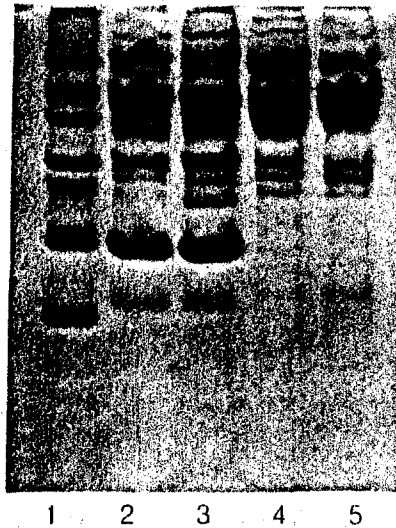


Fig. 24. SDS-PAGE patterns of Hanwoo, Holstein, pork and chicken meats.

Meat extracted with distilled water in the hind leg(Hanwoo, Holstein and pork) and leg (chicken). Lanes 1, molecular Weight markers; 2, Hanwoo, 3, Holstein; 4, pork; 5, chicken. Molecular weight of beef specific component was indicated in left lane.

증류수로 추출한 한우육, 홀스타인육, 돈육 및 계육을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 17% SDS-PAGE분석에 의해 한우육의 19.3kDa성분이 축종특이적 성분으로 확인되었으며(Fig. 24, lane 2, 3), 이 성분은 홀스타인육에서도 동일하게 검출되었다. 19.3kDa성분 이외에도 축종별 특이성분은 확인되었으나, 대부분이 미량성분인 관계로 본 연구에서는 한우육의 19.3kDa성분을 항원으로 정제하기로 하였다.

19.3kDa의 정제는 2년차 연구보고서에서 확립한 계육 특이성분의 정제방법과 동일하게 실시하였다. 400 μ g의 수용성 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 정제한 결과, 110.5 μ g이 회수되어 약 27.6%의 회수율을 나타내었다. 또한 정제한 19.3kDa의 순수도를 SDS-PAGE로 분석한 결과, 단일성분으로 확인되었다(Fig. 25, lane 3).

한우육, 돈육 그리고 계육 수용성 단백질을 75, 80, 90 그리고 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열 한 후, 내열성 단백질의 양을 조사한 결과, 돈육이 열에 대하여 가장 심한 열 변성이 일어나고 있는 것으로 나타났으며, 계육 및 우육은 유사한 경향을 나타내었다(Table 3). 그러나, 100 $^{\circ}$ C로 가열할 경우, 우육은 약 83% 열 변성되어 침전하였으나 계육은 약 78% 열 변성하는 것으로 나타났다. 또한 우육을 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열한 후, 그 내열성 획분을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 19.3kDa이 열에 매우 강한 것으로 확인되었다.

다. ELISA에 의한 우육의 검증

100 $^{\circ}$ C/30분간 가열한 후 회수한 내열성 획분을 3회에 걸쳐 토끼에 면역한 후(1mg/회), ELISA를 이용하여 그 역가를 검사하였다. 그 결과, 가열 우육은 비가열 우육보다 전체적으로 높은 역가를 나타내었으며, 1:32,000의 희석비율에서도 0.6이상의 O.D. 값을 나



1 2 3 4

Fig. 25. SDS-PAGE patterns of heated Hanwoo meat and purified Hanwoo specific component.

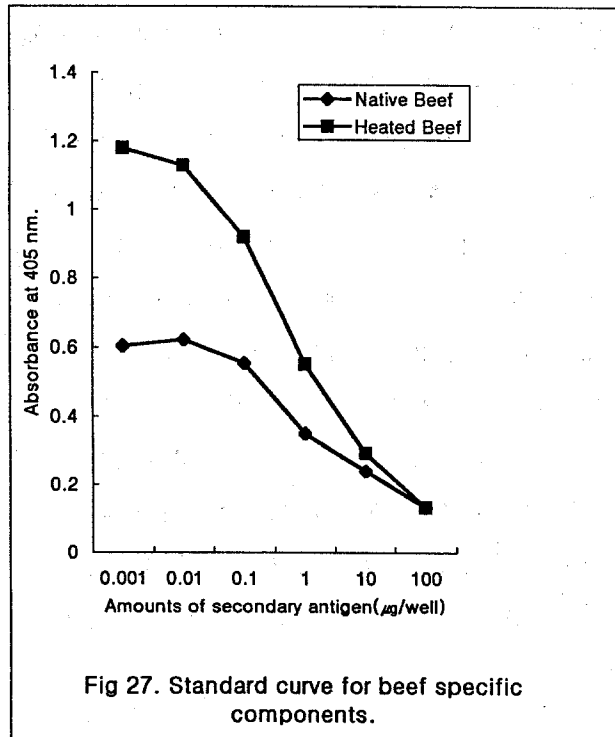
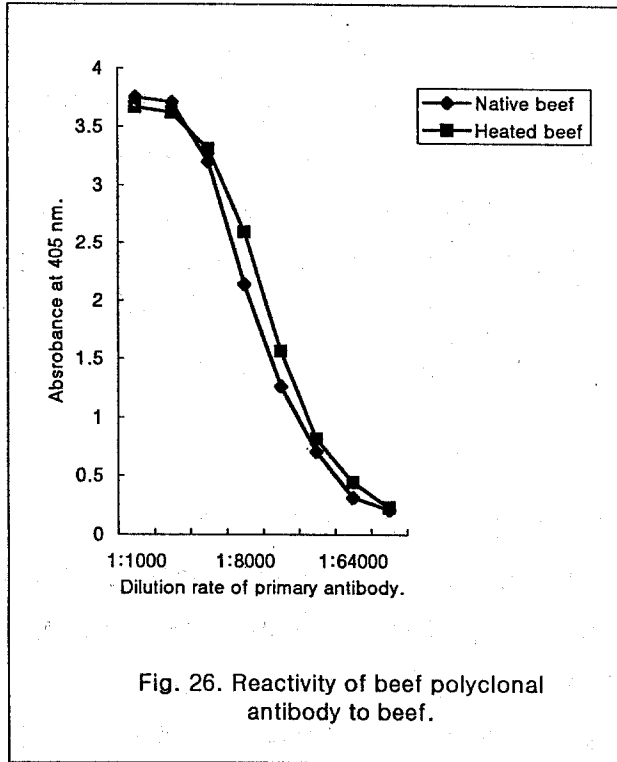
Lanes 1, molecular weight markers; 2, Hanwoo meat; 3, heated protein; 4, 19.7kDa.

타내었다(Fig. 26). 또한 가열 우육에 대한 감도가 높게 나타나 가열 축육제품중의 우육의 검증을 위하여 매우 효과적인 항체인 것이 시사되었다. 그러나, 우육 소시지의 경우, 1.0% SDS를 이용하여 추출한 후, 추출된 단백질 성분을 이용하여 iELISA를 실시한 결과, 그 역가는 매우 낮은 것으로 나타났으나, 항체를 1:1,000으로 희석할 경우 그 역가가 0.3이상인 것이 확인되어, 이를 이용한 육 혼합물 또는 육 가공품중의 우육의 검증이 가능 할 것이 시사되었다.

라. ciELISA에 의한 우육의 검증

ciELISA에 의한 비가열 및 가열 우육의 표준곡선을 작성한 결과, 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ 이상에서 거의 직선적인 경향을 나타내어, 본 연구에서 생산한 항체의 검출감도는 10ng인 것이 확인되었다(Gig. 27). 검출감도로 볼 때 비교적 낮은 수준이나, 그 경합의 양상이 농도의존성이 매우 강하여 원료육 단백질의 혼합물은 물론이고 축육제품중의 우육의 검증을 위하여 매우 유효 적절하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 비가열 우육에 대한 감도보다 가열 우육의 감도가 약 2배로 확인되었으며, 이는 가열 축육제품 중의 우육의 검증을 위하여 매우 유효하게 사용할 수 있으리라 사려된다.

우육 복합항체에 대한 우육, 돈육, 계육, 염소육, 오리육, 칠면조육, 토끼육, ISP, 그리고 계란 단백질의 경합반응을 검토하였다. 돈육 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 coating한 후, 실온에서 2시간 plate에 결합시킨 후, 각각의 육 단백질과 우육 복합항체와의 경합반응을 검사하였다. 그 결과, 우육은 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 에서부터 강한 경합반응이 일어나는 것이 확인되어, 본 연구에 의해 작성된 우육 복합항체는 우육 단백질과 특이적으로 결합하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 28). 또한 염소육의 경우, 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ 에서 우육의 약



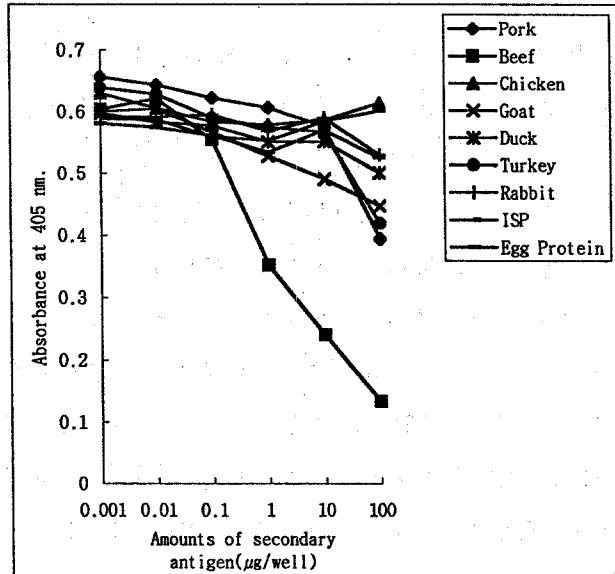


Fig. 28. Indirect competitive ELISA of pork, beef, chicken, goat, duck, turkey, rabbit, ISP, egg protein with beef polyclonal antibody.

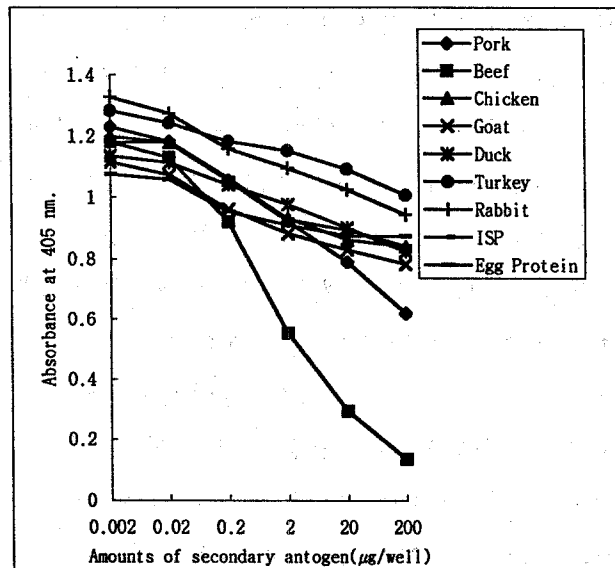


Fig.29. Indirect competitive ELISA of heated pork, beef, chicken, goat, duck, turkey, rabbit, ISP, egg protein with beef polyclonal antibody.

40%강도로 경합하고 있는 것이 확인되었다. 돈육 및 칠면조의 경우 약한 경합을 일으키고 있었으나, 우육의 검증에는 큰 영향을 일으키지 않는 수준으로 사려된다.

가열 육단백질과 우육 복합항체와의 경합반응을 조사한 결과, 비가열 육과의 경합반응보다 약하게 일어나고 있는 것이 확인되었다(Fig. 29). 염소육의 경우, 우육의 약 75%였으나, 다른 이종단백질은 비가열육의 결과와 유사하게 나타났다. 따라서 본 연구에 의해 작성된 우육 특이적인 항체를 이용하여 원료육 혼합물은 물론이고 축육제품중에 함유되어 있는 우육의 검증이 가능할 것으로 사려되며, 이를 확립하기 위한 지속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다.

마. Dot blotting에 의한 우육의 검증

Dot blotting을 이용하여 19.3kDa 및 내열성 우육 단백질에 대한 복합항체 검출한계를 측정한 결과 약 $10\mu\text{g}/\text{well}$ 이었으며(Fig. 30, lanes 1, 2), 농도 의존적인 감도를 나타내었다. 원료육 혼합물 또는 가공 육제품중에 혼입되어 있는 우육은 양적으로 매우 많으며, 농도가 매우 낮더라도 농축하는 것이 매우 간단하므로, 비록 ELISA의 검출감도보다 매우 낮은 수준이지만 그 실용성을 감안할 때, Dot blotting은 그 이용차기는 매우 크며, 현장적용을 위한 검출 Kit의 개발도 가능하리라 사려된다.

본 연구진에 의해 생산한 내열성 단백질에 대한 복합항체를 이용하여 돈육 및 계육과의 교차반응을 검사한 결과, 돈육과는 전혀 반응하지 않는 것이 확인되었다(Fig. 30, lane B). 그러나, 계육의 경우 $50\mu\text{g}/\text{well}$ 에서 약하게 교차 반응하였으나, 계육의 농도가 감소함에 따라 그 반응성이 없어지는 것으로 나타났다(Fig. 30, lane C). 따라서 이 복합항체를 이용한 원료육 혼합물 또는 가공

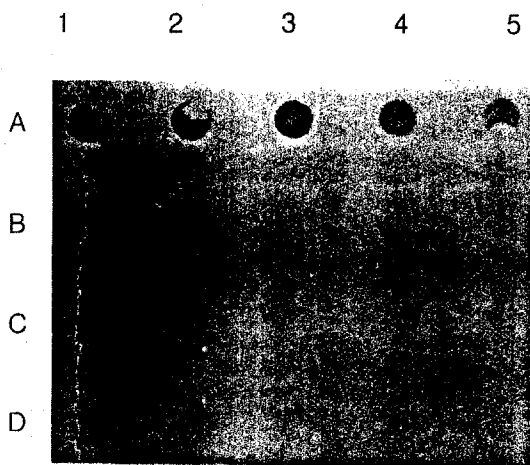


Fig. 30. Dot blotting patterns of antigen-antibody reaction with denatured Hanwoo polyclonal antibody.

Lanes A, heated Hanwoo meat; B, pork meat; C, chicken meat; D, 100% beef Sausage. Charged amounts was $50\mu\text{g}$, $40\mu\text{g}$, $30\mu\text{g}$, $20\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ and $1\mu\text{g}$ per well from 1 to 7. Antigens were heated at 100°C for 30min.

육제품중의 우육의 검색은 충분히 가능하리라 사려된다.

제4절 참고문헌

Amstrong, S. G. and Leach, D. N. : The use of HPLC protein profiles in fish species identification. Food chemistry. Vol. 44, p. 147(1992).

Ashwell, G., Harford, H. : Carbohydrate Specific Receptors of the Liver. Annu. Rev. Biochem. 51, 531(1982)

Bailey, E., Lear, T. L. : Comparison of Thoroughbred and Arabian Horses Using RAPD Markers. Anim. Genet. 25, 105(1984)

Bleil, J. D., Wassarman, P. M. : Mammalian Sperm-Egg Interaction: Identification of a Glycoprotein in Mouse Egg Zonae Pellucidae Possessing Receptor Activity for Sperm. Cell. 20, 873(1980)

Campbell, A. M. : Monoclonal antibody technology: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam. Vol. 13, p. 1(1984).

Chanh, T. C., Dreesman, G. R., Kennedy, R. C. : Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody Mimics the CD4 Receptor and Binds Human Immunodeficiency Virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3891(1987)

Chung, K. Y. 1992. Immunologische Untersuchungen zum Nachweis Nativer und Hitzedenaturierter Schweinefleischanteile in Fleischerzeugnissen Mitteles Agp, ELISA und Monoklonaler Antikoerper. Ph.D Dissertation

Ebbehoj, K. F., Thomsen, P. D. : Species Differentiation of Heated Meat Products by DNA Hybridization. *Meat Sci.* **30**, 221(1981b)

Garcia, T., Martin, R., Rodriguez, E., Azcona, J. I., Sanz, B., Hernandez, P. E. : Detection of Bovine Milk in Ovine Milk by a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *J. Food Protec.* **54**, 366(1981)

Garcia, T., Martin, R. K., Rodriguez, E., Morales, P., Hernandez, P. E., Sanz, B. : Detection of Bovine Milk in Ovine Milk by an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Dairy Sci.* **73**, 1489(1990)

Griffiths, N. M., Billington, M. J. : Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Beef Blood Serum to Determine Indirectly the Apparent Beef Content of Joints and Model Mixtures. *J. Sci. Food Agric.* **35**, 909(1984)

Hansen, T. J. : Immunochemical methods for mycotoxin detection in food products. *Trends in Food Sci. Technol.*, **1**, 83(1990)

Harlow, E. and Lane, D. : *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab., p421(1988)

Hawkes, R. : The dot immunobinding assay. *Methods Enzymol.*, **121**, 484-491(1986)

Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. : A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.*, **119**, 142-147(1982)

Herbrink, P., Van Büssel, F. J. and Warnaar, S. O. : The antigen spot test (AST) : A highly sensitive assay for the detection of antibodies. *J.*

Immunol. Methods, **48**, 293-298(1982)

Hitchcock, C. H. S., Crimes, A. A. : Methodology for Meat Species Identification: A Review. Meat Sci. **15**, 215(1985)

Jones, S. J., Patterson, R. L. S. : Double-Antibody ELISA for Detection of Trace Amounts of Pig Meat in Raw Meat Mixture. Meat Sci. **15**, 1(1985)

Jones, S. J., Patterson, R. L. S. : A Modified Indirect ELISA Procedure for Raw Meat Speciation Using Crude Anti-Species Antisera and Stabilised Immunoagents. J. Sci. Food Agric. **37**, 767(1986)

Kang'ethe, E. K., Jones, S. J., Patterson, R. L. S. : Identification of the Species Origin of Fresh Meat Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedure. Meat Sci. **7**, 229(1982)

Kemp, S. J., Teale, A. J. : Randomly Primed for Amplification of Pooled DNA Reveals Polymorphism in a Ruminant Repetitive DNA Sequence Which Differentiated *Bos Indicus* and *B. Taurus*. Animal Genetics. **25**, 83(1984)

King, N. L. and Kurth, L. : Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme staining of isoelectric focusing gels. J. Food Sci., **47**, 1608(1982)

Köhler, G., Milstein, C. : Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. Nature. **256**, 495(1975)

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265(1951)

Markwell, M. A. K., Suzanne M. H., Bieber L. L. and Tolbert, N. E. : A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, **87**, 206(1978)

Martin, R., Azcona, J. I., Carcia, T., Hernandez, P. E., Sanz, B. : Sandwich ELISA for Detection of Horse Meat in Raw Meat Mixtures Using Antisera to Muscle Soluble Proteins. *Meat Sci.* **22**, 143(1988a)

Martin, R., Azcona, J. I., Tormo, J., Hernandez, P. E. : Detection of Chicken Meat in Raw Meat Mixtures by a Sandwich Enzyme Immunoassay. *Inter. J. Food Sci. Tech.* **23**, 303(1988b)

Martin, R., Wardale, R. J., Jones, S. J., Hernandez, P. E., Patterson, R. L. S. : Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to Chicken Muscle Soluble Proteins. *Meat Sci.* **25**, 199(1989)

Martin, R., Wardale, R. J., Jones, S. J., Hernandez, P. E., Patterson, R. L. S. : Monoclonal Antibody Sandwich ELISA for the Potential Detection of Chicken Meat in Mixtures of Raw Beef and Pork. *Meat Sci.* **30**, 23(1991)

Patterson, R. M., Spencer, T. L. : Differentiation of Raw Meat from Phylogenically Related Species by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Meat Sci.* **15**, 119(1985)

Patterson, R. M., Whittaker, R. G., Spencer, T. L. : Improved Species Identification of Raw Meat by Double Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Sci. Food Agric.* **35**, 1018(1984)

Shin, H. K., Park, K. S., Lee, J. W. and Kim, J. B. : Studies on the development of ELISA for monitoring porcine myosin. *Korean J. Food Sci. &*

Tech., 25, 265(1993)

Skerritt, J. H. : Immunoassay of non-meat protein additives in foods. In development and application of immunoassay for food analysis (Rittenburg, J. H. ed). Elsevier Appl. Sci., London & New York, Vol. 81, p125(1990)

Whittaker, R. G., Spencer, T. L., Copland, J. W. : An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedure for Species Identification of Raw Meat. J. Sci. Food Agric. 34, 1143(1983)

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. : DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers. Nucleic A Res. 18, 6531(1990)

Wintero, A. K., Thomsen, P. D., Davies, W. : A Comparison of DNA Hybridization, Immunodiffusion, Counter Current Immuno-Electrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Mixture of Pork to Beef. Meat Sci. 27, 7(1990)

Wintero, A. K. and Thomsen, P. D. : A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, countercurrent immuno electrophoresis and isoelectric focation for detecting the admixture of pork to beef. Meat Sci., 27, 75(1990)

Yamamoto, F. : Molecular Genetic Basis of the Histoblood Group Abo System. Nature, London. 345, 229(1990)

Chung G. Y., Lee N. H., Rhim T. J. and Hwangbo S. : SDS-PAGE기법을 이용한 우육, 돈육 및 계육의 축종판별에 관한 연구. Korean J. Anim. Sci., 39(1997)

Kang, K. S., Jung, K. S., Cho, R. I., Sakada and Yoo S. H. : 한우육과 수입
우육의 판별 검사에 관한 연구. Korean J. Anim. Sci., **32**, 121(1992)

Hwangbo, S. and Chung, K. Y. : 계육 특이 단백질(50 kDa)의 정제 및 그 항체
생산에 관한 연구. 한국축산식품학회지. **17**, 257(1997)

Hwangbo S., Lhim T, J. and Chung G. Y. : 계육 특이항체를 이용한 원료육 단
백질의 검색. 한국축산식품학회지. **18**. (1998)

여 백

수입육에 대응한 국내산 축육의 경쟁력 향상을
위한 분석기술 개발 (협동과제-2)

Development of Systems for the Evaluaton of
Imported Beef

1998. 12. 20

연구기관
한동대학교

여 백

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “첨단분석기법을 이용한 미량비타민의 분석, 원료단백질의 식별 및 수입육의 평가시스템 개발” 과제 (세부과제 “수입육에 대응한 국내산 축육의 경쟁력 향상을 위한 분석기술 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 손 동 화

협동연구기관명 : 한 동 대 학 교

협동연구책임자 : 현 창 기

연 구 원 : 신 현 길

연 구 원 : 박 종 흠

연 구 원 : 이 주 운

연 구 원 : 김 성 배

연 구 원 : 정 석 규

연 구 원 : 이 미 애

여 백

요 약 문

I. 제 목

수입육에 대응한 국내산 축육의 경쟁력 향상을 위한 분석기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라의 연간 육류소비규모는 연간 3,000 ~ 5,000 억원규모로 매년 증가 추세에 이르고 있으나, 외형적으로 급속히 커지는 내수시장의 규모에 비해 식육의 열악한 유통 구조로 인해 수입육이 국내생산 축육으로 둔갑 판매되는가 하면 수입 냉동육이 냉장육으로 판매되는 불법적 판매방식이 근절되지 않고 있다. 따라서 위와 같은 현상은 생산자로부터 최종소비자 사이에서 형성되는 판매 차액의 대부분이 중간 유통업자에게 돌아가게 되어 있어 우리나라 축산농가의 경쟁력은 그만큼 나빠지고 있는 것이다. 이러한 불법적 유통구조 근절을 위한 방책으로 정부와 학계에서는 수입육과 한우육의 판별방법의 개발이라는 목적아래 종간 특이성을 DNA상에서 검출할 수 있는 RFLP (restricted fragment length polymorphism) 방법 등 여러 가지 과학적인 접근방법들을 제시하여 왔다. 그러나 수입육이나 국내 생산육의 가축이 단일종이 아니며, 국내에서 생산되는 육우 대부분을 무조건 한우라고 칭하고 있다는 점과 그동안 한우 형질개량을 위해 오래전부터 외국으로부터 우수한 유전자를 많이 도입해 옴으로써 국내산 한우의 순수한 혈통은 찾아보기 힘들다는 점으로 인해 실제 이 방법을 실용화하기는 불가능한 것으로 판단된다. 즉 아직 실용화할 수 있는 현실적인 방법은 확립되지 않고 있어 보다 간편하고 신속 정확한 방법이 요구되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 수입육의 경우 수입기간에 따라 도축후 오랜 시간이 경과함으로 이 기간동안 육단백질의 변성이 일어나고 세포내 DNA가 손상됨에 착안하였다. 즉 수입육은 선박으로 수입되면서 60~90일간의 냉동기간을 거쳐야 한다는 점과 지육의 경우에는 다시 업체에 의해서

소매 판매를 위하여 해동과 냉동이 최소한 2회 이상 반복되어야 한다는 점, 이와는 대조적으로 국내산 신선육은 도축한지 3일 이내에 소비되고 있다는 차이점을 이용하여 수입육을 간편하게 판별해낼 수 있는 방법을 찾아내고자 하였다. 우선은 특정 단백질의 변성 정도를 신속하게 측정하기 위하여 근육 단백질인 myosin과 그의 효소적 분해에 의해 생산된 subfragment를 항원으로 하는 복합클론항체 (polyclonal antibody) 를 이용하여 동결처리 중에 발생하는 myosin의 변성정도를 측정할 수 있는 ELISA 방법을 개발하고자 하였으며, 한편으로는 DNA의 손상정도를 신속히 측정할 수 있는 Comet assay를 동결육과 신선육내 DNA 손상 측정에 응용하는 방법을 개발하고자 하였다. 또한 현재 여러나라에서 식육의 보존성을 높이기 위한 방사선 조사가 허용되어 있으므로 Comet assay를 통해 수입육의 방사선 조사 여부를 간편하게 판별할 수 있는 방법을 아울러 시도하였다. 개발된 ELISA 및 Comet assay 방법에 대해서는 각각 또는 두 방법의 복합적인 이용을 통해 동결 및 냉장기간을 추정하고 국내산 축육과 수입육을 판별할 수 있는 실용화 가능성을 평가하고자 하였다.

본 연구에서 시도하는 면역학적 방법과 Comet assay법의 적용은 동결처리 및 저장 중에 단백질의 변성과 DNA의 손상이 수반되는 현상을 감안할 때 매우 실용화 가능성이 높은 것으로 판단된다. 이러한 새로운 판별방법의 확립을 통하여 앞서 설명한 여러 경제적 사회적 문제들을 해결할 수 있는 대안이 제시될 것으로 기대된다. 한편 식육의 유통기간 연장과 위생을 향상시키기 위한 방편으로 방사선 조사가 식육 유통에 현실적인 대안으로써 제시되고 있다. 이 경우 수입 냉장육 뿐만아니라 국내에서 생산된 우육의 경우도 방사선이 조사된 상태로 유통될 수 있으며, 국내의 열악한 유통구조하에서 방사선에 대한 소비자 불안 심리를 역이용한 비조사 신선육으로의 둔갑판매라는 불법행위가 일어날 가능성이 높다. 방사선의 조사는 DNA의 손상을 쉽게 유발시키기 때문에 본 연구에서 이용하는 Comet assay법은 매우 적절한 측정방법이라 할 수 있으며 방사선 조사 우육에 대한 유통문제과 관련해서도 정확한 판별법으로 제시될 것으로 판단된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

과제	연구개발범위	
ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발	<ol style="list-style-type: none"> 1. Myosin 및 그 subfragments의 분리와 항체의 생산 2. 우육의 냉장 및 동결처리에 따른 변성도 측정 3. 수입육에 대한 평가 	<ul style="list-style-type: none"> · Myosin의 분리 · Myosin으로부터 myosin heavy chain 및 light chain의 분리 · 효소적 분해에 의한 myosin heavy chain으로부터 subfragments의 분리 및 정제 · Myosin 분자와 그 subfragments의 면역 및 항체 생산 · 항체의 분리 및 정제 · Ci-ELISA 조건의 확립 · Inter 및 intra assay에 의한 신뢰성 검정 · 냉장저장에 의한 myosin 분자의 변성도 측정 · 동결저장에 의한 myosin 및 그 subfragment의 변성도 측정 · 해동 및 냉동 반복처리에 의한 변성도 측정 · 시중에서 유통되고 있는 수입육의 검색
육의 저장중 DNA손상 측정을 위한 Comet assay법의 개발	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comet assay법의 확립 2. 우육의 처리방법에 따른 DNA 손상도 조사 3. 수입육과의 비교 4. ELISA 법과 Comet assay를 이용한 육의 변성정도의 추정 	<ul style="list-style-type: none"> · 육조직으로부터 DNA 핵체의 분리 · Lysis 방법의 설정 · Electrophoresis 방법의 설정 · Tail length/moment 결과의 분석 · 냉장저장에 의한 우육의 DNA 손상 정도의 검사 · 동결기간에 따른 우육의 DNA 손상 정도의 검사 · 동결 및 해동 반복처리에 의한 DNA 손상 정도의 검사 · 방사선조사량에 따른 DNA 손상 정도의 검사 · 국내산 신선우육의 DNA 변성 정도 검사 · 수입우육에 대한 DNA 변성 정도의 평가

IV. 연구개발결과

1. ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발

우선 myosin 및 myosin의 S-1, light meromyosin(LMM) subfragment를 분리 정제하고 이들 각각에 대한 항체를 생산하여 확립된 ELISA 조건에 따라 분석한 결과, 각 항체는 매우 특이성이 높았으며 회수율도 매우 우수하였다. 이 방법을 따라 우육의 냉장 및 동결처리에 따른 변성도를 측정할 결과, myosin과 LMM의 동결저장에 따른 면역반응성(immunoreactivity)은 저장기간이 경과됨에 따라 점차 감소하는 경향을 보여주었는데 특히 LMM의 경우가 두드러져 동결저장 중의 변성이 주로 light meromyosin(LMM) 부분에서 발생되고 있다는 것을 보여주었다. 동결저장온도는 -20°C 의 경우가 가장 심한 반응성 변화를 초래하였다. 한편 동결과 해동을 반복할 경우는 myosin, S-1, LMM 모두 면역반응성의 변화가 매우 크게 나타났으며 동결기간에 따른 변화에 비해 더 심한 감소현상을 보여주었다. 냉장저장에 의한 myosin 분자의 반응성 변화는 15일 저장기간 동안 어떠한 유의성도 발견되지 않음으로써 본 연구에서 사용한 통제구 (24시간 예냉을 거친 식육)를 기준값으로 사용할 수 있다고 판단되었다. 이와 같이 확립된 방법을 따라 무작위로 구입한 수입육의 동결 처리 결과를 분석한 결과, 저장기간과 해동횟수 등의 조사에서 얻은 값을 수입육에 비교하였을 때 수입육의 면역반응력결과로부터 시료육의 동결저장 기간과 해동횟수에 대한 추정이 가능하였다. 얻어진 결과로부터 수입육 판별방법으로서의 ELISA법은 충분한 실용화 가능성을 나타내었으며, 보다 구체적인 분석 조건을 확정하고 보다 많은 무작위 추출 수입육 시료에 대하여 blind test를 수행하는 연구를 뒷받침하여 현장에서 사용할 수 있는 분석방법을 확립할 수 있을 것으로 판단되었다.

2. 저장중 DNA손상 측정을 위한 Comet assay법의 개발

Comet assay 수행방법 중 가능한 온도를 낮추고 물리적인 조건하에서

핵체를 분리한 후 중성의 조건하에서 실험(neutral lysis와 neutral electrophoresis)을 하는 것이 최적 조건임을 확인하였다. 우선 우육 시료의 냉장에 의한 DNA 손상은 3일까지 근육핵내 DNA 손상의 급격한 증가를 나타내다가 3일 이후부터는 완만한 증가세를 나타내었으며, 손상등급은 다양한 분포를 나타내었다. 동결기간에 따라 나타나는 손상의 경우는 동결처리에 의해 일어난 손상도가 동결저장 시간에 따라서는 유의성있는 차이를 보이지 않았고 핵들의 손상등급 분포 또한 냉장에 의한 경우와 유사하였다. 동결 및 해동 반복처리에 의한 DNA 손상정도를 검사한 결과, 동결 해동 1회(1 cycle)는 비처리 신선육과 구분할 수 없었으나 2 cycle부터는 그 손상의 정도가 급격하게 증가되었으며, 3 cycle부터는 냉장이나 동결기간과는 매우 다른 아주 심한 손상등급내의 핵들의 급격한 증가를 보였다. 한편 방사선 조사량에 따른 DNA 손상정도의 검사를 위해 신선우육에 방사선 처리를 하였을 경우, 이미 1 kGy 이상의 조사구부터 냉장저장 우육, 동결저장 우육과는 확연히 구별되는 손상의 특징적인 형태를 나타내었으며, 1 kGy의 손상 특징이 동결 해동 반복 3 cycle의 손상형태와 유사한 결과를 나타내었다. 이상과 같이 얻어진 분석조건을 토대로 무작위 구입한 수입육에 대한 blind test를 실시한 결과, 우선 mean tail length 값으로 비교할 때는 평균적으로는 수입육의 손상도가 큰 것으로 나타났으나 개별적인 수입육 시료에 대해서는 한우육과 구별할 수 없는 경우가 다수 존재하는 것이 확인되었다. 그러나 tail length로 구분한 손상등급별로 핵들의 분포정도를 비교하였을 때 수입육과 한우육은 손상이 없는 등급과 가장 심한 손상등급에서 특징적인 분포를 나타냄으로써, Comet assay를 수입육 판별에 이용함에 있어서는 mean tail length의 단순한 비교보다는 양쪽 극단의 손상등급에 대한 분포도를 비교함으로써 유의성있게 판별을 수행할 수 있는 것으로 판단되었다.

V. 활용에 대한 건의

본 연구는 수입육의 국내 생산육으로 둔갑 판매됨으로 인해 발생하는 문제를 해결하기 위한 방안으로서 수입육과 국내 생산육을 판별해낼 수 있는 방법을 개발하고자 ELISA법과 Comet assay법의 적용을 시도하였다. 연구로부터 얻어진 결과를 토대로 다음과 같은 활용방안을 제안하고자 한다.

1) ELISA법과 Comet assay법 모두 연구초기에 착안하였던 판별원리에 의하여 육질에 따른 측정치의 차이가 유의성있게 나타남으로서 판별방법으로서의 적용 가능성을 보여주었다. 특히 정밀도 측면에서는 ELISA법이 우수한 결과를 보여 실용화에 한층 가까운 방법임이 확인되었다. 따라서 적용 가능성이 확인된 이 방법들에 대한 실용화 연구단계를 추진시켜야 한다. 우선 보다 정밀한 측정결과를 얻기위해 다양하고 세밀한 측정조건에 대하여 정밀도 검정 실험을 거쳐 최적 측정조건을 실용화에 맞도록 확립하여야 할 것이다. 이로써 국내 식육유통 시장에 대한 감시기관에서 공식적으로 이용할 수 있는 공인 실험방법으로 확립할 수 있다.

본 연구팀에서는 이러한 실용화 연구의 목적으로 계속 연구를 진행할 계획이다. 과학재단으로부터의 지원을 받아 '수입 농축산물의 안전성 평가를 위한 Immunoassay 및 Comet assay법 개발'이라는 연구과제를 1999-2000년까지 2년간 진행한다. 이 연구과제를 통하여 기관에서 사용할 수 있는 구체적인 실험방법이 확립되어 보급 가능할 것으로 기대된다.

2) 실용화 연구의 2단계는 식육유통 현장에서 사용할 수 있도록 kit화하는 등의 간편한 측정방법으로의 확립이다. 이를 위해서는 측정의 간편성과 비용에 주안점을 두어 까다로운 실험재료 준비과정을 줄여 실험순서를 최소화하고 까다로운 시약과 재료는 원터치 형식의 시약으로 제조하여 kit 판매 유통기한 내의 안정성 검증을 거쳐야 할 것이다. 또한 측정이 저렴한 가격으로 이루어지도록 시약과 재료의 원료를 산업적으로 생산 가능한 것들로 대체하여야 한다.

3) 본 연구로부터 얻어진 연구결과만으로도 육질의 평가를 위한 측정은

실용화 연구없이 직접 이용가능한 것으로 판단된다. 따라서 육질 평가가 필요한 기관이나 연구실 등에 본 연구의 측정방법을 보급할 수 있다.

4) 본 연구에서 확립된 측정방법은 수입육 뿐만 아니라 수입 농축산물 전반에 걸쳐 활용 가능성이 매우 높다. 본 연구에서의 결과에서 설명하였듯이 특히 ELISA법은 수입육에 대한 무작위 추출실험에서 시료의 처리과정을 예측할 수 있는 측정결과를 제공하였다. 이러한 원리에 기초하여 수입 축산물의 처리상태를 판별하고 국내 생산 축산물과의 판별이 가능할 것이다. Comet assay는 본 연구에서의 수입 냉동 냉장육에 대한 직접 판별능력은 ELISA법에 비해 떨어지나 손상된 DNA 핵체의 분포도를 이용하여 간접적인 처리상태 판별이 가능할 것이다. 특히 Comet assay는 방사선 조사 조직에 대하여 민감한 측정치를 나타내므로 방사선 조사 수입 농축산물에 대한 안전성 평가를 위해 매우 유효하게 이용될 수 있다.

여 백

S U M M A R Y

The size of domestic meat market, about 300~500 billion won a year, is so large but the circulation system is not sound in its structure. Especially, there are illegal sellings of imported meat product damaging the basis of domestic livestock farmers in retail markets. The imported meat product are on sale as domestic-produced meat product, and the imported frozen meat as chilled meat. With a aim of the establishment of order in the circulation of meat product, there have been several studies on the discrimination between imported and domestic meat products. For example, RFLP (restricted fragment length polymorphism) method was developed to detect the specificity in bovine species using DNA analysis. However, it has some limitations caused by the hybridization of domestic bovine genes with introduced genes foreign genes, and there is no practical analysis tool for this purpose at present. In this study, we tried to apply ELISA technique and Comet assay to develop a discriminating analytical method. We focused on the facts that the imported meat products have to be preserved for long time (frozen for 60-90 days shipping) and be frozen and thawed repeatedly, undergoing the denaturation of meat proteins and the damages on DNA molecules. Myosin, a meat protein, and its subfragments obtained by enzymatic hydrolysis were separated and purified. By immunizing a rabbit with the purified myosin and its subfragments, the anti-myosin, anti-subfragments polyclonal antibodies were obtained for Ci-ELISA analysis. The immunoreactivities of

freezing-preserved and freezing-thawing repeated meat samples were decreased in proportion to the freezing-preservation time and the number of freezing-thawing times. The established conditions for Ci-ELISA were suggested as being used in the discrimination of imported meat products from domestic ones. The DNA damage data on the meat samples showed by Comet assay were proportional to the refrigeration time until 3 days and the number of freezing-thawing times. It was found that the group pattern of damaged DNA molecules was more useful for the determination of 'meat history' than the direct index of DNA damage. It was concluded that the ELISA and Comet assay techniques used in this study have a significant potential possibility for the development of a practical method and the subsequent step to establish the more concrete conditions is needed to achieve that purpose.

CONTENTS

Chapter V. Development of Systems for the Evaluation of Imported Beef

Section 1. Introduction	257
1. Objectives and justification of research	257
2. Backgrounds of research	259
Section 2. Materials and methods	261
1. Discrimination of frozen meat by ELISA technique	261
A. Myosin separation and optimization of ELISA	261
B. ELISA of chilled and frozen meats	265
C. Estimation of imported meats by ELISA	267
2. Measurement of DNA damage in meat products by	
Comet assay	268
A. Optimization of Comet assay	268
B. Comet assay of chilled and frozen meats	270
C. Estimation of imported meat by Comet assay	272
Section 3. Results and Discussion	272
1. Discrimination of frozen meat by ELISA technique	272
A. Separation of myosin and its subfragments and	
their antibody production	272
B. Separation of myosin subfragments and optimization	
of ELISA	277
C. ELISA of chilled and frozen meats	284
D. Estimation of imported meats by ELISA	299
2. Measurement of DNA damage in meat products by	
Comet assay	299
A. Optimization of Comet assay	299
B. Comet assay of chilled and frozen meats	302
C. Estimation of imported meat by Comet assay	310
Section 4. References	312

여 백

목 차

제 5 장 수입육에 대응한 국내산 축육의 경쟁력 향상을 위한 분석기술 개발

제 1 절 서 설	257
1. 연구개발의 목적과 필요성	257
2. 연구개발의 배경	259
제 2 절 재료 및 방법	261
1. ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발	261
가. Myosin의 분리 및 정제와 ELISA 조건의 확립	261
나. 우육의 냉장 및 동결처리에 따른 변성도 측정	265
다. 수입육에 대한 평가	267
2. 육의 저장 중 DNA 손상 측정을 위한 Comet assay법의 개발	268
가. Comet assay법의 확립	268
나. 우육의 이화학적 처리방법에 따른 DNA 손상도 조사	270
다. 수입육과의 비교	272
제 3 절 결과 및 고찰	272
1. ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발	272
가. Myosin 및 그 subfragments의 분리와 항체의 생산	272
나. Myosin subfragment의 분리 및 정제와 ELISA 조건의 확립	277
다. 우육의 냉장 및 동결처리에 따른 변성도 측정	284
라. 수입육에 대한 평가	299
2. 육의 저장 중 DNA 손상 측정을 위한 Comet assay법의 개발	299
가. Comet assay법의 확립	299
나. 우육의 이화학적 처리방법에 따른 DNA 손상도 조사	302
다. 수입육과의 비교	310
제 4 절 참고문헌	312

여 백

제 5 장 수입육에 대응한 국내산 축육의 경쟁력 향상을 위한 분석기술 개발

제1절 서 설

1. 연구개발의 목적과 중요성

우리나라의 연간 육류소비규모는 연간 3,000-5,000억원 규모로 매년 증가 추세에 이르고 있으나, 외형적으로 급속히 커지는 내수시장의 규모에 비해 식육의 열악한 유통 구조로 인해 수입육이 국내생산 축육으로 둔갑 판매되는가 하면 수입 냉동육이 냉장육으로 판매되는 불법적 판매방식이 근절되지 않고 있다. 따라서 위와 같은 현상은 생산자로부터 최종소비자 사이에서 형성되는 판매 차액의 대부분이 중간 유통업자에게 돌아가게 되어 있어 우리나라 축산농가의 경쟁력은 그만큼 나빠지고 있는 것이다. 따라서 수입냉장 및 냉동육과 국내 생산육의 신속한 판별방법의 개발을 통한 유통체계의 확립은 무엇보다 시급한 현실이다. 이를 위해 지금까지 중간 특이성을 DNA상에서 검출할 수 있는 RFLP (restricted fragment length polymorphism) 등과 같은 유전학적 방법을 통해 수입육과 국내 생산육의 판별을 시도하는 연구가 많이 진행되었으나, 수입육이나 국내 생산육의 가족이 단일종이 아니며, 국내에서 생산되는 육우 대부분을 무조건 한우라고 칭하고 있다는 점과 그동안 한우 형질개량을 위해 오래전부터 외국으로부터 우수한 유전자를 많이 도입해 옴으로써 국내산 한우의 순수한 혈통은 찾아보기 힘들다는 점으로 인해 실제 이 방법을 실용화하기는 불가능한 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 수입육의 경우 수입기간에 따라 도축후 오랜 시간이 경과함으로 이 기간동안 육단백질의 변성이 일어나고 세포내 DNA가 손상됨에 착안하였다. 즉 수입육은 선박으로 수입되면서 60~90일간의 냉동기간을 거쳐야 한다는 점과 지육의 경우에는 다시 업체에 의해서 소매

판매를 위하여 해동과 냉동이 최소한 2회 이상 반복되어야 한다는 점, 이와는 대조적으로 국내산 신선육은 도축한지 3일 이내에 소비되고 있다는 차이점을 이용하여 수입육을 간편하게 판별해낼 수 있는 방법을 찾아내고자 하였다. 우선은 특정 단백질의 변성 정도를 신속하게 측정하기 위하여 근육 단백질인 myosin과 그의 효소적 분해에 의해 생산된 subfragment를 항원으로 하는 복합클론항체 (polyclonal antibody) 를 이용하여 동결처리 중에 발생하는 myosin의 변성정도를 측정할 수 있는 ELISA 방법을 개발하고자 하였으며, 한편으로는 DNA의 손상정도를 신속히 측정할 수 있는 Comet assay를 동결육과 신선육내 DNA 손상 측정에 응용하는 방법을 개발하고자 하였다. 또한 현재 여러나라에서 식육의 보존성을 높이기 위한 방사선 조사가 허용되어 있으므로 Comet assay를 통해 수입육의 방사선 조사 여부를 간편하게 판별할 수 있는 방법을 아울러 시도하였다. 개발된 ELISA 및 Comet assay 방법에 대해서는 각각 또는 두 방법의 복합적인 이용을 통해 동결 및 냉장기간을 추정하고 국내산 축육과 수입육을 판별할 수 있는 실용화 가능성을 평가하고자 하였다.

본 연구에서 시도하는 우육 단백질 myosin의 변성정도를 면역학적으로 측정하는 방법과 DNA 손상정도를 측정할 수 있는 Comet assay법의 적용은 동결처리 및 저장 중에 단백질의 변성과 DNA의 손상이 수반되는 현상을 감안할 때 매우 실용화 가능성이 높은 것으로 판단된다. 이러한 새로운 판별 방법의 확립을 통하여 앞서 설명한 여러 경제적 사회적 문제들을 해결할 수 있는 대안이 제시될 것으로 기대된다. 한편 식육의 유통기간 연장과 위생을 향상시키기 위한 방편으로 방사선 조사가 식육 유통에 현실적인 대안으로써 제시되고 있는 지금, 수입 냉장육 뿐만아니라 국내에서 생산된 우육의 경우도 방사선이 조사된 상태로 유통되거나, 국내의 열악한 유통구조 하에서 방사선에 대한 소비자 불안 심리를 역이용한 비조사 신선육으로의 둔갑판매라는 불법행위가 일어날 가능성이 높다. 방사선의 조사는 DNA의 손상을 쉽게 유발시키기 때문에 본 연구에서 이용하는 Comet assay법은 매

우 적절한 측정방법이라 할 수 있으며 방사선 조사 우육에 대한 유통문제와 관련해서도 정확한 판별법으로 제시될 것으로 판단된다.

2. 연구개발의 배경

육은 동결 중에 단백질 용해성의 감소, 근섬유 단백질들(주요하게 myosin)의 변성, 색택의 변화, 해동에 따른 육즙의 손실로 인한 조직의 경화(硬化)등이 일어나며 이러한 요인들이 육의 품질을 손상시킨다(Wagner *et al.*, 1985; 1986 I, II; Dobraszazyk *et al.*, 1987; Lannari *et al.*, 1991). Grujic 등(1993)은 *M. longissimus dorsi*의 동결에 따른 초구조적 조사(ultrastructural investigation)를 통하여 온도대에 따른 빙결정의 위치, 모양 그리고 크기가 근육 구성분에 미치는 영향을 조사하였다. 그들은 근섬유내에 myofibrils가 ice crystal의 압력에 의해서 영향을 받아 횡축 줄 모양(transverse striation pattern)이 붕괴된다고 하였다. 그리고 근세포 내부에 생긴 깊은 골은 보수력 상실의 원인이 되는 I-segments와 Z-line내부에서 발견되었다고 보고하였다. 또한 많은 연구등을 통해서 동결 처리와 동결 기간 중에 발생하는 변화가 animal meat과 fish meat의 질에 영향을 미친다는 것이 보고되었으며, 근육단백질의 변성, 특히 근섬유 단백질의 변성은 육질을 저하시키는 중요한 역할을 한다고 보고되고 있고(Wagner, *et al.*, 1986). 이러한 변성 정도를 억제하려는 연구가 시도되기도 하였다(Sakata *et al.*, 1995). 이러한 육질의 저하를 판별하기 위해서 동결 저장 중 육의 보수성, 용해성 및 점도와 전기영동에 의한 근섬유 단백질들의 변화등이 조사되었다. Gottesmann과 Hamm(1983)은 분광광도법과 색택 평가법을 사용하여 β -hydroxyacryl-CoA- dehydrogenase(HADH)을 분석하여 신선육과 동결 해동육을 판별하는 실험을 수행하였다. 그리고, Ellerbroek 등(1995)과 Chen등(1988)은 동결 후 해동시 유출되는 mitochondria내에 존재하는 효소들의 헤리 정도의 차이를 응용한 APIZYM(a semi quantitative method/Enzyme Profile Test)법으로 신선육과 동결-해

동육을 구별할 수 있는 연구를 하였다. 그러나, 전자의 방법은 특별한 기술을 요하거나 긴 처리 공정을 필요로 하기 때문에 분석에 어려움이 있고, 후자의 방법은 육이 -12°C 나 그 보다 더 낮은 온도에서 저장되었을 때만 단지 의존할 수 있기 때문에 동결 기간이나 해동-재동결의 횟수 등은 알 수 없다. 최근에는 면역 분석법에 의하여 단백질의 정성과 구조 단백질의 변성 측정에도 이용되고 있다(Shin *et al.*, 1993; Franek *et al.*, 1994; Sargeant 1993; Martin *et al.*, 1991; Rodriguez *et al.*, 1991). 항원-항체 반응의 기본 기전이 항원에 존재하는 항원결정기(epitope)에 대한 항체의 인식에 의한 결합 반응이라는 것을 착안하여, 항원의 변성이 epitope의 구조적 변화를 야기시키고 이런 구조적 변화에 대한 항체의 인식 정도를 결합 반응으로서 나타낼 수 있다(Shin *et al.*, 1993). 그러므로 변성된 단백질과 그의 항체는 결합 반응 정도가 native protein보다는 더 낮게 나타나게 되며 이 원리를 이용하여 변성도를 측정할 수 있었다. 육의 동결처리에 대한 판별을 위해서 DNA의 손상도를 측정하는 것도 좋은 방법일 것이다. DNA를 동결이나 방사선조사에 의한 변성 marker로서 그 손상 정도를 측정할 수 있는 매우 기대되는 방법중의 하나로 single cell micro-gel electrophoresis(SCGE, Comet assay)법이 있다(Johanson, 1991; Cerda *et al.*, 1993). SCGE법은 다양한 포유동물세포에 있어 여러 처리에 의해 발생하는 DNA 손상(damage)과 수복(repair)를 측정하는 방법으로서 in vivo와 in vitro연구에 이미 사용되어 오고 있다(Singh *et al.*, 1991; Olive *et al.*, 1990; Tice *et al.*, 1990; Ostling and Johanson, 1984, 1987). 또한 혈액시료에서 간단히 lymphocyte를 추출하여 산화(oxidation), UV나 이온화 방사선(ionizing radiation) 등(Singh *et al.*, 1988; Green *et al.*, 1992)에 대한 감수성을 screening할 수 있는 biomonitoring method로서 SCGE가 응용된 경우도 있으며, Fierbairn등(1994)은 조직별로 동결, 동결 기간과 동결해동반복에 따른 DNA 손상측정에도 응용한 바 있다. 식품에의 SCGE의 응용은 1991년 Johanson이나 Cerda 등이 방사선조사육(meat)과 골

수(bone-marrow)세포의 DNA손상을 측정하는 것으로 시작되었으며, 이 방법의 장점은 기존에 언급하였던 측정방법에 비하여 간단하고 신속하며 매우 저렴하게 실시할 수 있는 잇점을 가지고 있으며, 실제 이용된 경우로 감자, 양파, 가금육 및 우육에서 방사선 조사여부 뿐만아니라 조사량에 따른 DNA 손상정도의 증가도 판별할 수 있는 가능성을 제시하였다(Delincee, 1993).

본 연구에서는 근육 단백질 myosin과 그의 효소적 가수분해물로부터 얻어진 subfragment를 항원으로 하는 복합클론 항체(polyclonal antibodies)를 생산, 분리 정제하여 indirect competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay(Ci-ELISA)를 확립하고 동결 처리에서 발생하는 myosin의 변성 정도를 조사하여 신선육과 동결 해동육을 쉽게 판별할 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 하였다. 한편 수입육의 경우 수입기간에 따라 도축후 오랜 시간이 경과함으로서 세포내의 DNA가 손상됨에 착안하여 DNA의 손상정도를 신속히 측정할 수 있는 Comet assay를 적용, 수입육을 간편하게 조사할 수 있는 방법을 찾아내고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발

가. Myosin 및 그 subfragments의 분리와 항체의 생산

1) Myosin의 분리

지금까지 근육으로부터 myosin분자를 분리하는데에는 Quass(1968)의 방법을 수정보완한 방법을 이용하여 왔으나, 다른 myofibrillar proteins에 의해 오염되거나 수율이 낮게 나타나는 관계로, 본 실험에서는 Choi(1991)의 방법을 보완한 이(1995)의 방법을 사용하였다. Myofibrillar

protein들이 대체로 강한 염농도와 강이온의 조건하에서 용해되는 성질을 이용하여 이온강도가 다른 두 가지 용액을 사용하여 분리하였고, 항체를 생산하기 위해서 사용되는 단백질 항원은 그 순도가 항체의 감도에 직접적인 영향을 주기 때문에 분리된 단백질의 순도를 높이기 위해서 DEAE cellulose (Whatman DE52) anion exchange column chromatography법과 Sephadex G-200 gel filtration chromatography법을 사용하였다. 분리된 myosin은 SDS-PAGE (10% polyacrylamide) 상에서 순수도를 확인하였다.

2) Myosin으로부터 myosin heavy chain 및 light chain의 분리

Myosin은 두개의 heavy chain과 3개의 light chain으로 구성되어 있어 머리부분과 꼬리부분으로 나뉘어지며 papain과 trypsin에 의해 가수분해시키면 S-1, S-2, light meromyosin으로 분리된다. Myosin분자 자체가 매우 크고 그로 인해 분자내에 존재하는 epitope이 약 5,000개 정도이므로 정확하게 항원(myosin)의 동결처리에 따른 변성을 알기에는 너무 편차가 크다고 할 수 있다. 따라서 myosin분자를 α -chymotrypsin으로 처리하여 균일하게 분해시킨 subfragment들을 항원으로 얻고자 하였다. Holts(1975) 등의 방법에 의해 myosin 분자의 ATPase 활성화에 관여하여 근수축과 이완작용의 생리적 기능을 수행하는 head에 S-S bond에 의해 결합되어 있는 light chain들을 분리하고 이온강도에 의해 침전시켜 myosin heavy chain을 회수하였다.

3) 효소적 분해에 의한 myosin heavy chain으로부터 subfragments의 분리 및 정제

또한 분리된 myosin heavy chain으로부터 좀더 세분화된 각각의 subfragments를 얻기 위하여, Weed(1977) 등의 방법을 이용하여 myosin 분자를 α -chymotrypsin으로 효소적 처리를 하였고 저이온강도와 고이온강도에서 각각의 절편들이 용해되거나 불용성을 침전하는 특성을 이용하여 분리하였다. 각 분획의 순도를 높이기 위하여 DEAE cellulose ion exchange chromatography와 Sephadex G-100 (또는 G-75, G-150) gel filtration

chromatography를 실시하였다. ELISA법에서 이용할 항원들은 MWM (myosin whole molecule)과 myosin head 부분 절편인 S-1 (subfragment-1), myosin tail 부분 절편인 LMM(light meromyosin)으로 각각 칭하였다.

4) Myosin 분자와 그 subfragments의 면역 및 항체 생산

분리·정제된 myosin, 그리고 각각의 subfragments에 대한 복합클론 항체를 생산하기 위하여 항원 용액을 200 μ g/ml의 농도로 보정한 후 동량의 Freund's Complete adjuvant를 잘 혼합하여 New Zealand white 종 토끼에 면역하였다. 추가면역부터는 complete adjuvant 대신 incomplete adjuvant를 사용하였으며 5회 주사 후 ear-bleeding으로 혈액을 채취하여 혈장(serum)을 분리하고 농도를 1:100에서 1:35,600까지 희석하여 생산된 항체의 역가를 조사하였다. 1주일 후, Boosting법으로 항원 용액을 주사한 후 1주일 이 지난 다음 십장에서 혈액을 채집하였다.

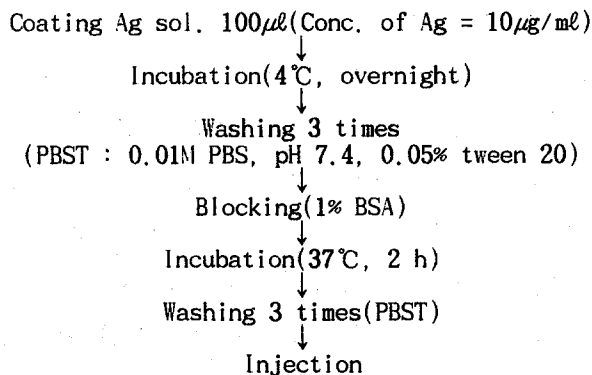
5) 항체의 분리 및 정제

Myosin, 각각의 subfragments에 대한 각각의 항체(IgG)를 분리하기 위하여 얻어진 항혈청을 Affinity Gel protein A MAPS II Kits를 사용하여 affinity chromatography (PBS buffer(0.01M PBS, pH 7.4, 0.15M NaCl)로 용출시킨 후, 0.1M acetic acid(pH 4.0)로 흡착된 IgG를 용출)를 실시하였다. 분리된 IgG 용액은 PBS buffer로 투석한 후, polyethylene glycol 20,000으로 농축하였다. 최종농도를 4 mg/ml로 보정한 다음 동량의 glycerol로 잘 혼합하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

6) Indirect ELISA 조건의 확립

항원을 coating하는 방법으로 competitive indirect ELISA(Ci-ELISA)법을 확립하였다. Coating에는 myosin 분자의 낮은 pH와 염농도에서 침전하는 특성으로 인해 basic 용액 (0.1M sodium carbonate, pH 9.6)을 사용하였다. 또한 blocking 용액으로는 1% bovine serum albumin (BSA) 용액과 1% gelatin 용액을 고정화 용액으로 사용했을때 1% gelatin 용액에서 항체와의 non serum blank값이 높게 나와 분석시 간섭이 일어나므로 1% BSA용

액을 사용하였다. 이차항체로는 horse radish peroxydase (HRP)를 conjugation한 goat anti-rabbit IgG를 사용하였다. 항원 고정화 농도와 항체의 희석배수 그리고 이차항체의 희석배수를 구하여 분석 최적 조건을 확립하기 위해 Shin(1993)의 방법에 따라 항원 고정화 농도를 0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 부터 25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지, 일차항체의 희석배수를 1:200부터 1:51,200까지, 이차항체의 희석 배수는 1:5,000부터 1:160,000까지로 하여 반응정도 (BT/B0)의 값이 50%를 유지하는 농도를 조사하여 본 분석 실험에 사용하는 최적 농도로 결정하였다. Washing buffer는 tween 20을 0.05% 첨가한 0.01M PBS buffer를 사용하였고, 각 단계의 반응은 37°C에서 2시간씩 처리하였다. 세척 용액(PBST)은 tween 20을 0.05% 첨가한 0.01M PBS buffer를 사용하였고 각 단계의 반응은 37°C에서 2시간 배양하여 반응시켰다. 기질 용액으로는 hydroxy peroxide를 첨가한 O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD)를 사용하였고, 반응을 종결시키기 위하여 2.0N H2SO4를 사용하였다. 반응액은 최종적으로 ELISA reader로 490nm의 파장에서 O.D 값을 측정하였다. 확립된 Ci-ELISA 방법을 도식화하면 그림 1과 같다. 한편 근육 구성 단백질 중 주요하게 존재하는 다른 myofibrillar protein들 중에서 큰 범위를 차지하는 actin과 troponin compound에 대한 anti-bovine myosin IgG의 교차 결합을 조사함으로써 동결육 변성도 측정시의 간섭여부를 조사하였다.



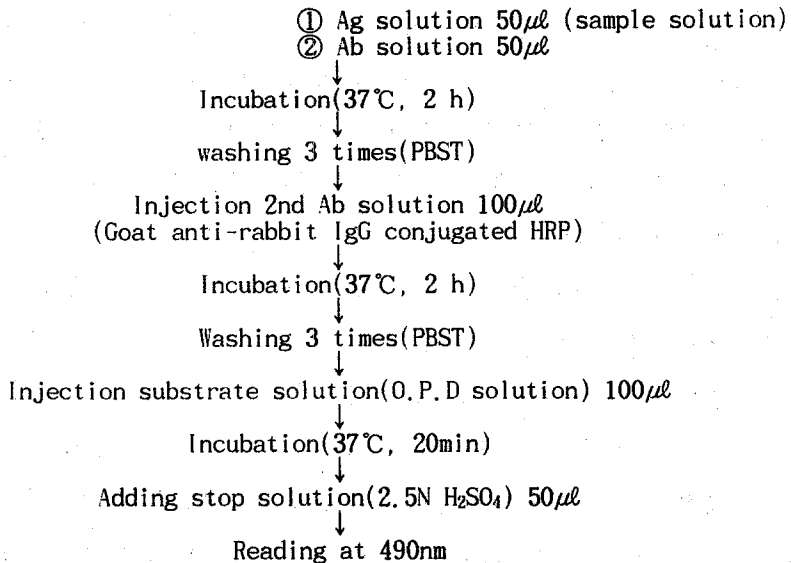


Fig 1. Procedure of ELISA method

7) Inter 및 intra assay에 의한 신뢰성 검정

또한 각각의 항원에 대한 IgG의 교차 결합도 (cross reactivity)를 측정된 결과로부터 intra assay variance와 inter assay variance 값을 구하여 확립된 분석조건이 유의성을 갖고 이용될 수 있는지를 검정하였다.

나. 우육의 냉장 및 동결처리에 따른 변성도 측정

1) 단백질 용해성(MPS) 측정

육단백질은 동결 저장기간 중 용해성의 변화가 일어나는 것으로 알려져 있지만 용해성의 변화만으로는 정확한 동결처리 여부에 대한 지표로 삼기는 어렵다. 따라서 본 연구에서는 용해성의 변화가 ELISA 법에 의해 검출되는 항원항체 반응과의 관계를 조사하여 비교 분석하였다. 실험에 사용되는 시료는 도축 후 24시간이 경과한 한우 *M. semitendinosus*를 구입하여 실험내용에 따라 동결처리하거나 냉장육 상태로 이용하였다. 단백질 용해

성 실험을 위해서는 아래에서 설명하는 방법으로 동결처리한 시료를 Park 등(1994)의 방법으로 4°C 저온항온기에서 해동한 다음 중심부에서 2 g의 시료를 취하여 40 ml의 염용액(0.6 M NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0)을 첨가한 다음 10,000 rpm으로 3 분간 균질 후, 다시 30초 후에 1 분간 균질하고 10,000 rpm으로 30 분간 4°C에서 원심분리하였다. 분석에 간섭을 일으키는 지방과 작은 입자들을 제거하기 위하여 상등액을 여과지(Whatman No.3)에 의해 여과하고 그 여액을 단백질 농도 측정을 위한 BCA법과 변성 측정을 위한 ELISA법에 사용하였다.

단백질 용해성(myofibrillar protein solubility, MPS) 은 근육단백질 추출용액중에 존재하는 단백질의 농도를 BCA법으로 측정하여 평가하였다. 여과된 용액을 100 μ l씩 시험관에 취하고 시약을 1 mL 첨가한 후 잘 섞은 다음 100 μ l씩 microwell에 옮겨 37°C에서 20분간 배양한 다음 ELISA reader에서 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 단백질의 농도를 측정하였다. 표준 단백질 용액으로는 BSA 용액을 사용하였다.

2) ELISA 법에 의한 myosin의 변성도 측정

여과된 시료 여액 50 μ l를 취하여 blocking과 washing 단계를 끝낸 microwell에 넣은 후 일정농도(1:2,500)로 희석된 각 항원에 대한 항체 용액(anti-MWM, anti-S-1 그리고 anti-LMM IgG)을 50 μ l 넣은 후, 앞에서 확립된 방법에 따라 반응시켰다. 반응 후 얻은 O.D. 값을 기준으로 표준곡선 상에서 myosin의 함량을 구하였다. 얻어진 myosin 함량(myosin content, MC)과 MPS에 대한 myosin 농도의 비(MT)를 산출하여 통제구(신선육, MC)에서 얻은 값에 대한 백분율로써 동결처리에 의한 myosin과 항체와의 면역반응성(immunoreactivity, IR)을 나타내었다. 산출식을 표시하면 아래와 같다.

$$MT \text{ or } MC (\%) = \frac{MC (\mu\text{g}/\text{ml})}{MPS (\mu\text{g}/\text{ml})} \times 1000$$

$$IR (\%) = \frac{MT}{MC} \times 100$$

3) 동결처리에 따른 변성도 측정

가) 동결저장에 의한 myosin 및 그 subfragment의 변성도 측정

동결저장용 시료는 과도한 지방과 결합조직 등을 제거한 후 두께가 1 cm 정도 되도록 잘라 진공포장하여 -10, -20, -50 그리고 -80°C deep freezer에서 공기순환식 냉동방법으로 동결하고 30일마다 6개월까지 시료를 취하였다. 각 시료에 대하여 단백질 용해성과 myosin 변성도를 측정하였다.

나) 해동 및 냉동 반복처리에 의한 변성도 측정

원료육 시료를 앞의 방법과 동일하게 처리하고 직경이 약 10 cm 정도 되는 부위를 절단하여 무게가 대략 1 kg 되게 하였다. 시료는 진공포장 후 곧바로 앞서와 마찬가지로 방법으로 동결시키고 30 일마다 4°C 저온항온기에서 중심온도가 2°C가 될 때까지 해동한 후 적당량의 시료를 채취한 다음 다시 진공포장하고 재동결시켜 저장하였다. 채취한 시료에 대하여 단백질 용해성과 myosin 변성도를 측정하였다.

4) 냉장저장에 의한 myosin 분자의 변성도 측정

수입육의 경우 일정기간 동안의 냉장 숙성과정을 마친 후 포장되어 선적되기 때문에 동결육의 변성을 측정할 때 냉장 저장 기간 동안의 myosin의 변화가 영향을 미칠 수 있다고 판단되어 냉장 중의 myosin의 변성도를 측정하였다. 원료육을 4°C에서 진공포장하여 저장하면서 15일까지 단백질 용해성과 myosin의 변성도를 측정하였다.

다. 수입육에 대한 평가

수입육과 신선육의 평가실험을 위한 시료는 한국 축산물 유통 사업단에서 수입된 쇠고기의 *M. semitendinosus*를 무작위로 40 개체분을 얻어 위의 방법과 같이 처리하여 변성도를 측정하였다. 이 실험의 통제구로는 동

결처리하기 전에 취한 20 개체의 *M. semitendinosus* 시료를 같은 방법으로 처리하여 사용하였다.

2. 육의 저장중 DNA손상 측정을 위한 Comet assay법의 개발

Comet assay는 손상된 DNA 분자가 전기영동 상에서 손상으로 인해 생긴 가닥절편(strand break)들에 의해 혜성(comet)과 같은 모양으로 이동되는 특성을 이용하는 방법으로 single cell micro-gel electrophoresis(SCGE) 법이라고도 하는데, 여러 DNA 분자들의 comet에 대한 tail length와 tail moment의 통계치로부터 손상정도를 측정하게 된다. 본 연구에서는 이 방법에 의해 동결이나 방사선 조사에 의한 육시료의 변성정도를 측정하고자 조건을 확립하는 실험을 진행하였다.

가. Comet assay 법의 확립

1) Pre-coated agarose slide의 준비

Fully-frosted slide glass의 서리가 되어 있는 면에 0.5% normal melting point agarose(NMA) 용액 35 μ l를 precoating한 후에 화염건조시키고, 다시 75 μ l의 0.5% NMA 용액을 cover glass를 이용하여 균일하게 깐 후 ice bath위에서 5 분간 방치하여 gel을 형성하였다. 이와 같이 만들어진 pre-coated agarose slide는 humidified slide box에 넣어 실험전까지 4°C에 보관하였다.

2) 조직으로부터 핵체의 분리

근육세포로부터의 핵체 추출방법은 효소작용에 의해 조직으로부터 분리하는 방법과 물리적인 방법에 의해서 분리하는 방법으로 나누어 실험하였다.

효소로 분리할 경우, 우선 시료를 surgical blade로 근섬유방향으로 얇게 slicing하고, 이중 1.5 g을 0.006% collagenase P 용액 (in PBS buffer) 8 ml에 담가 37°C에서 30분간 반응시키고, 반응이 완전히 끝난 시

료액을 100 μm 표준망에 통과시킨 후 이어서 25 μm 표준망에 통과시켜 잔사를 제거한 뒤 핵체 현탁액으로 사용하였으며, 준비된 현탁액은 실험전까지 ice bath에 보관하였다. 물리적인 방법에 분리할 경우에는 Cerda(1993)의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉, 시료를 surgical blade로 근섬유방향으로 얇게 slicing하고, slice된 시료 1.5 g을 cold PBS 완충액 8 ml에 담근 후 hot plate에서 500 rpm의 속도로 5 분간 균질화시켰다. 균질화된 시료액은 앞의 방법처럼 표준망으로 통과시켜 실험전까지 ice bath에 보관하였다.

3) 핵체의 슬라이드 삼입

핵체를 pre-coating된 slide위에 깔기 위하여 Delincee(1993)의 방법을 일부 수정하여 이용하였다. PBS에 녹아 있는 1% low melting point agarose(LMA)용액을 microwave로 녹인 후 항온수조내에서 45 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 핵체분산액 50 μl 와 NMA 용액 100 μl 를 희석하여 그 중 100 μl 를 미리 만들어 놓은 pre-coating된 agarose slide 위에 흘리고 cover glass를 덮어 균일하게 퍼지게 한 다음 ice bath위에 올려 놓아 gel을 형성시켰다.

4) Lysis

핵체를 lysis하는 방법으로는 두가지 방법을 이용하였다. 첫번째로는 alkali buffer에 lysis하는 방법으로서 2.5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris base, 1% Na-lauroylsarcosinate를 첨가하고 pH 10.0으로 조정된 용액에, 사용하기 바로 전에 10%의 DMSO와 1%의 Triton X-100을 첨가하여 slide를 1시간동안 담구어 lysis하였다. 두번째로는 neutral buffer를 이용하여 lysis하는 것으로서, 0.2% SDS, 40mM Tris-acetate, 1mM Na₂EDTA를 넣은 용액을 pH 8.0로 한 neutral lysis 용액에 nucleoids embedded slide를 30분간 담구어 lysis하였다.

5) Electrophoresis

Lysis로 핵막과 DNA결합 단백질이 제거된 상태에서 전기영동을 실시하였다. 이로서 핵이 포함된 agarose gel 내에는 염색질 덩어리만 남게되

는데, 이 염색질을 구성하는 DNA strand에 strand break가 있다면 electric field 상에서 가닥절편(strand break)상의 노출된 phosphate 분자들에 의하여 그 절편들이 양극 방향으로 끌리게 된다. 즉 가닥절편의 양이 많으면 많을수록 양극으로 이동된 절편의 양은 많아지게 되고 이동길이가 늘어나게 되어 DNA 손상정도를 파악할 수 있게 된다. 조직으로부터 DNA 손상을 정량화하기 위한 최적 조건을 확립하기 위하여 이 가닥절편을 전기장에서 이동하는 방법으로서 pH 13.0 이상 및 pH 8.0에서 전기영동하는 두 가지 방법을 이용 비교하였다. 두 방법에 의해 각각 전기영동된 slide는 형광염색 시약 YOYO-1(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μl 로 염색하고 cover glass를 덮은 후, 20~30분간 풍건시키고 현미경상에서 comet image를 분석하였다.

6) Comet analysis 및 결과 분석

염색된 slide는 fluorescence microscope($\times 250$)으로 관찰하면서 CCD video camera를 통해서 전송된 이미지를 Comet II image analysis system 이 장착된 computer상에서 image를 분석하였고, DNA 손상정도는 slide당 101개의 핵체들을 측정하였다. DNA 손상정도를 정량화하는 기준에는 tail length, percentage DNA in tail, tail moment와 tail inertia (Hellman 등, 1995) 등이 있으나, 본 연구에서는 tail length와 tail moment로서 DNA 손상정도를 수치화하였다. 수치화된 tail length에 대한 평균치와 함께 40 μm 이하, 40-55 μm , 55-70 μm , 70-85 μm , 85-100 μm , 100 μm 이상으로 구분한 tail length 범위에 속하는 세포(핵체)의 분포도를 비교하여 DNA 손상의 형태와 정도를 구분하였다.

나. 우육의 이화학적 처리방법에 따른 DNA 손상도 조사

1) 냉장저장에 의한 우육의 DNA 손상정도의 검사

본 실험의 시료로서 우육은 포항소재 (주)명신산업에서 구입하였으며 도축 후 10시간이 경과하지 않은 것으로 *M. Triceps brachii*와 *M. semitendinosus* 두 부위를 9 개체에 대하여 실험하였다. 각각의 시료는 지

방을 가능한한 제거하고 두께 약 1.5 cm가 되게 고깃결의 90 각도로 잘라 실험시 조직 slide를 용이하게 할 수 있도록 분할·정형한 후 진공포장하였다. 냉장기간에 따른 DNA 손상의 조사는 열흘간의 냉장기간에 따라 저온 배양기에서 $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ 를 유지하면서 기간별 실험에 이용하였다.

2) 동결기간에 따른 우육의 DNA 손상정도의 검사

동결기간에 따른 차이는 -20°C 의 일반냉동온도와 -50°C 의 온도에서 진공포장상태로 장기간 13개월까지 보관하면서 실험을 실시하였다. 실험시 동결시료는 18°C 유수(流水)에서 해동하였으며, 중심부에서 시료를 취하였다.

3) 냉동 및 해동 반복처리에 의한 변성도 측정

진공포장된 시료들은 지방이 제거된 lean meat을 두께가 1.5 cm정도 되도록 정형한 후 진공포장하여 -20°C 의 일반냉동온도와 -50°C 의 온도에서 동결하였다. 동결후 매 3일마다 시료를 18°C 유수에서 해동한 것을 반복 1 cycle 로 하여 6 cycle까지 반복 동결해동을 실시하였다. 실험시 해동후 중심부에서 시료를 취하였다.

4) 방사선조사량에 따른 DNA 손상정도의 검사

진공포장된 시료를 대덕연구단지 소재 원자력연구소 식품응용센터 방사선식품공학실에서 ^{60}Co 100,000 ci irradiator를 사용하여 표 1에 따라 0 에서 10 kGy로 조사하여 실험에 사용하였다.

선원 선종	^{60}Co γ -ray				
	흡수선량	0	1	3	5
조사율	0	0.333	1.0	1.667	3.333
조사시간	3 h				

표 1. ^{60}Co irradiation dose irradiated on beef sample

다. 수입육과의 비교

국내산 우육과 수입육과의 비교실험을 하기 위한 일환으로 수입육의 경우 포항 수입정육코너에서 판매되고 있는 다수의 시료를 구입하여 앞서의 방법에 의해 분석을 실시하였다. 또한 통제구로써 냉장판매되고 있는 한우육을 마찬가지로 무작위로 구입하여 분석하고 얻어진 결과를 비교하여 수입육 대비 한우육의 차이판별을 시도하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. ELISA를 이용한 동결처리육의 판별방법의 개발

가. Myosin의 분리 및 정제와 ELISA 조건의 확립

1) Myosin의 분리 및 정제

Myosin의 분리는 Choi(1991)의 방법을 보완하여 chromatography법을 사용하여 순도를 높였다. 분리된 myosin 분자의 전기영동도는 그림 2에 나타내었다. Lane 4번과 5번은 Choi의 방법에 의하여 분리된 myosin 용액내에 존재하는 단백질들의 전기영동 결과로 분자량 70,000, 60,000 정도의 단백질들이 존재하였으며 actin(45,000)과 troponins(TT: 35,000, T1: 21,000, TC:18,000)과 기타 30,000 이하의 분자량을 가진 다른 단백질들이 혼입되어 있는 것으로 표준 단백질에 비해 순도가 떨어지는 것이 판별되었기 때문에 항체 생산용 항원으로서는 더 많은 정제과정을 거쳐야 하였다. Weeds(1977)의 방법에 따라 DEAE cellulose 이온교환수지에 의하여 1차 정제를 실시하였다. 그림 3A는 0.04M sodium pyrophosphate(pH 7.4)를 이동상으로 하여 얻은 chromatogram이다. 분획 10번부터 20번 사이에 낮은 농도지만 이온 흡착이 일어나지 않는 일부 물질들이 분리되었다. 용출 용액

을 0.5M NaCl, 10 mM sodium phosphate(pH 7.0)으로 교체한 후 이온교환수지에 결합되어 있던 흡착물질들을 분리하였다. 이때의 분획도는 그림 3B에서 볼 수 있듯이 16번부터 30번 사이에서 검출되었지만 최소 두가지 이상의 물질들이 같이 분리되었음을 나타내었다. 이 분획들의 전기영동 결과는 그림 2의 lane 6 과 7 번에 나타내었다. 이온교환수지의 처리후에는 actin이 다수 존재하였기 때문에 이 분획들을 다시 polyethylene glycol 20,000을 사용하여 5 ml까지 농축시키고 0.5M KCl, 10mM phosphate 완충액에 투석한 다음 Sephadex G-200 gel filtration chromatography를 실시하였다(그림 4). Myosin은 분획 16번에서 24번 사이에서 분리되었으나 전기영동 결과(그림 2, lane 8, 9)를 살펴보면, 여전히 약간의 actin 분자가 존재하는 것으로 판단되었다.

2) 항 myosin 항체의 생산 및 정제

항 bovine myosin 항체(IgG)의 분리 및 정제를 위하여 Affi-Gel protein A Maps II kit를 이용하였다. 그 분획도는 그림 5와 같다. 이중 분획 3번부터 5번까지의 분획들을 모아 0.01M PBS buffer에 투석한 후 polyethylene glycol 20,000으로 농축시키고 동량의 glycerol을 섞어 -20 °C에 보관하며 bovine myosin에 대한 항체용액으로 사용하였다.

3) Indirect ELISA법의 확립

최적 반응조건을 설정하기 위하여 실시하였던 항원과 항체의 농도는 Ag coating 농도가 10 µg/mL, 일차 항체의 희석배수가 1:5,000, 그리고 이차항체의 희석배수가 1:20,000일 때 반응정도 (BT/BO)값이 50%를 나타내어(그림 6) ELISA 조건으로 확립되었다. 이후의 모든 실험은 이 조건하에서 실시하였다. 항원의 농도에 따른 표준곡선은 그림 7에 나타내었다. 검출범위는 0.5 µg/mL에서 500 µg/mL까지였고, 감도는 약 0.5 µg/mL이었다. 이 감도는 Dincer 등(1987)이 보고한 0.1 µg/mL 보다는 다소 낮지만 동결변성을 측정하는 실험에서는 큰 문제가 되지 않을 것으로 생각되었다.

근육 구성 단백질을 주되게 존재하는 다른 myofibrillar protein중에

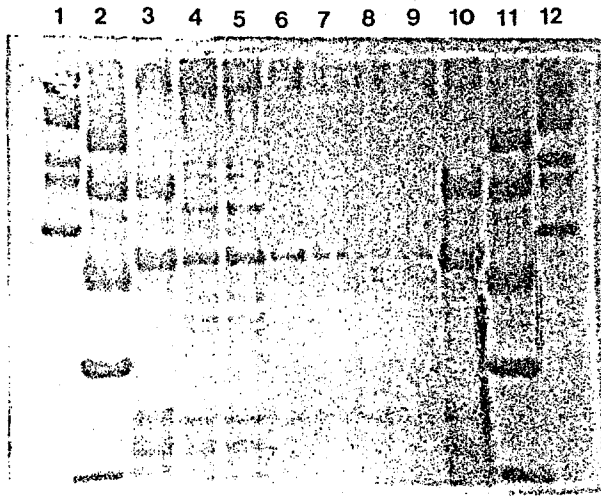


Fig. 2. SDS-PAGE (10% acrylamide) of proteins purified from bovine muscle

Lane 1, 12 : High molecular weight standard (myosin heavy chain: 212,000, α 2-macroglobulin:170,000, β -galactonase:116,000, transferrin:76,000, glutamic dehydrogenase:53,000)
 Lane 2, 10 : Low molecular weight standard (phospholylase b:94,000, bovine serum albumin: 67,000, ovalbumin: 43,000, carbonic anhydrase: 30,000, α -lactalbumin:14,400)
 Lane 3, 10 : Muscle proteins (myosin heavy chain: 212,000, bovine serum albumin: 67,000, actin: 45,000, troponin T: 35,000, troponin I:21,000, troponin C:18,000, myosin light chain I: 25,000, myosin light chain 2: 18,000, myosin light chain 3: 16,000)
 Lane 4, 5 : after separation
 Lane 6, 7 : after ion exchange chromatography
 Lane 8, 9 : after gel filtration chromatography

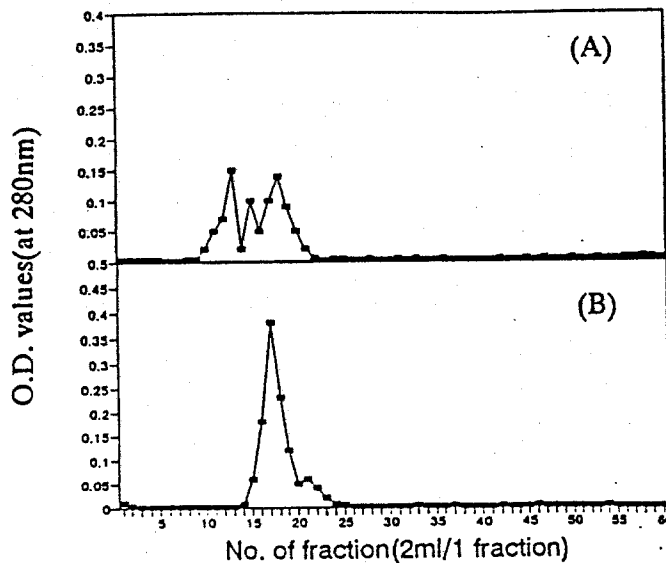


Fig. 3. DEAE cellulose ion exchange chromatogram of myosin
 (A) under effluent buffer condition (0.04 M Na-phosphate, pH 7.4)
 (B) under elute buffer condition (0.5 M NaCl, pH 7.0)

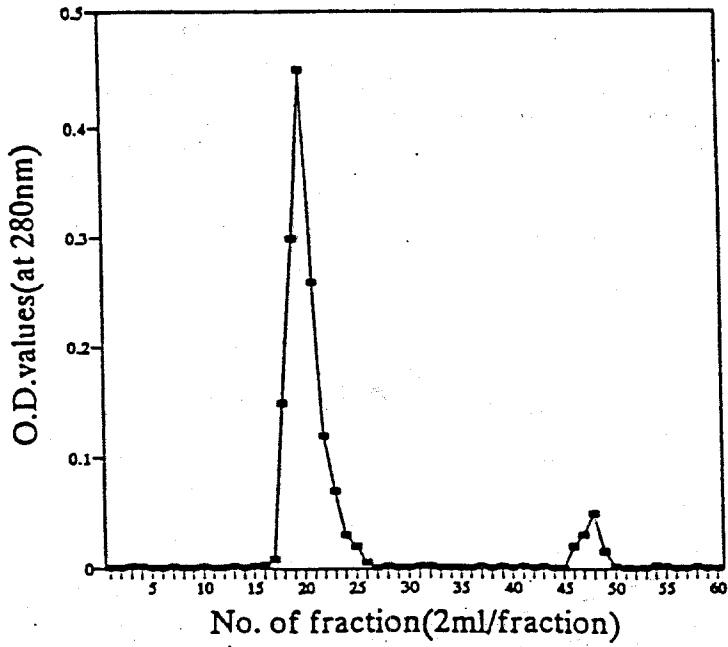


Fig. 4. Sepadex G-200 gel filtration chromatogram of myosin

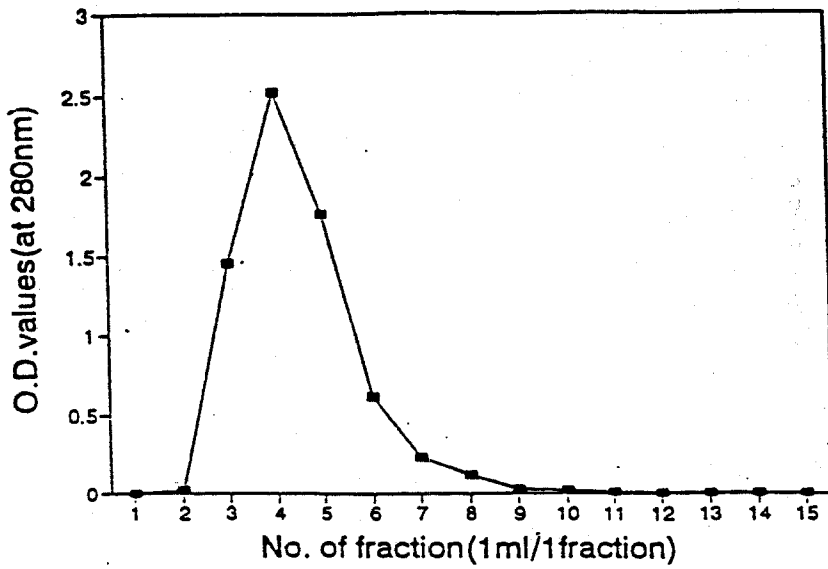


Fig. 5. Aff-Gel Maps II affinity chromatogram of anti-myosin IgG

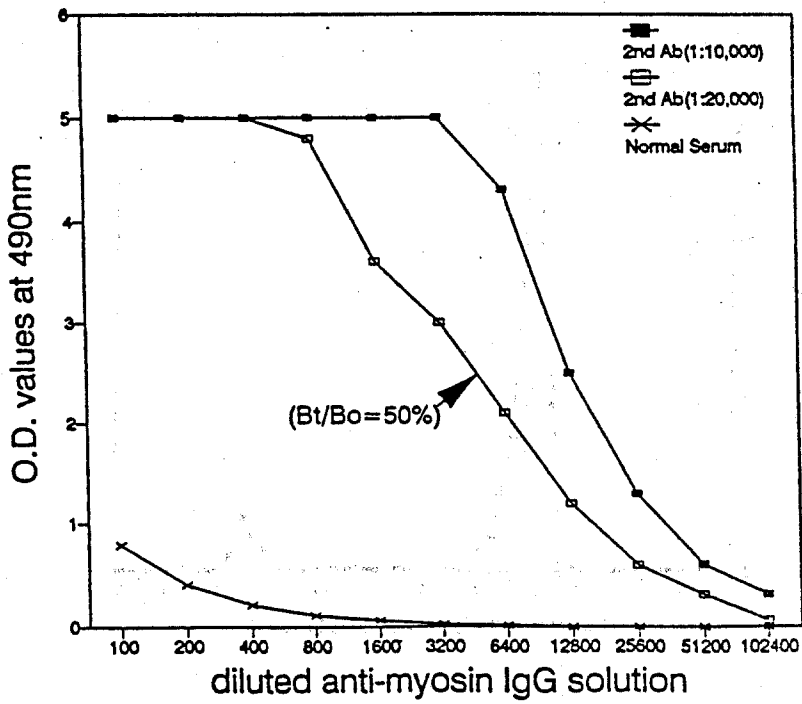


Fig. 6. Titration curve for the determination of optimal ELISA condition

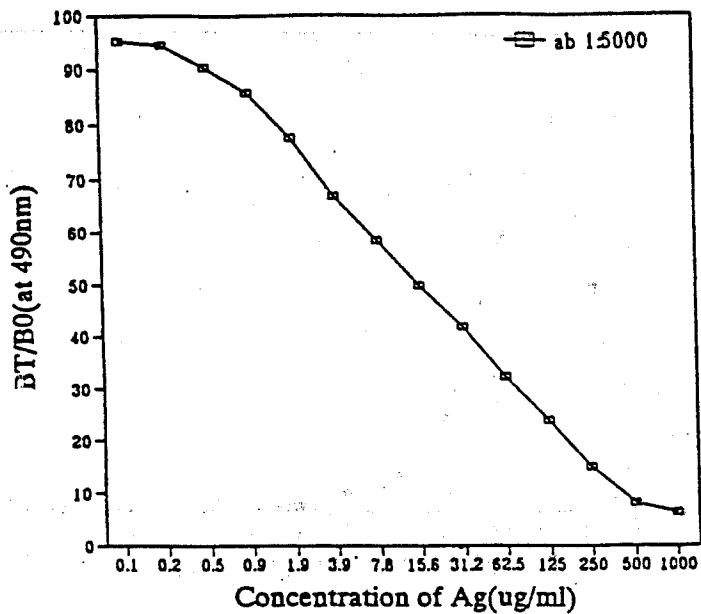


Fig. 7. Standard curve of ELISA for myosin

서 가장 큰 부분을 차지하는 actin과 troponin 화합물에 대한 항 myosin IgG의 교차결합은, myosin에 결합을 100% 하였을 때, actin이 10.4%, troponin이 6.3%로 나타났지만 동결변성도 측정시 기본값으로써 assay value에서 제외시키면 분석시 문제가 없을 것으로 판단되었다.

4) Intra-inter assay varience

Intra-inter assay varience 값은 일반적으로 ELISA 법이 실험법으로 유의성이 있는가를 평가하기 위해 실시하는 방법이다. 시간별과 횟수에 따른 일반적인 편차값이 10 이하일 때, 그 분석법이 인정된다. 표 2에서 나타난 바와 같이, intra-inter assay 값이 2.5~11.0 사이의 값 ($p < 0.05$)을 보여 주었으므로 이 방법을 이용할 때 문제가 없는 것으로 인정되었다.

회수율 검사에서도 표 3에 보이는 것처럼 회수율의 값은 상당히 높았으며 96% 이상의 값으로 그 유의성과 정밀성이 매우 높게 나타났다. 오차의 백분율도 전체 +1.7 ($p < 0.05$)로 양호하게 나타났다. 따라서 bovine myosin의 동결변성도 측정을 위해 개발된 competitive indirect ELISA 법은 그 유의성과 정밀함이 높게 나타났으며 이후 시행하는 동결변성 실험에 이용가능한 것으로 판단되었다.

나. Myosin subfragments 의 분리 및 정제와 ELISA 조건의 확립

1) Myosin의 heavy chain과 light chain의 분리

Holts 등(1975)이 이용하였던 5M guanidine과 4M urea를 사용하여 myosin light chain을 분리하였다. 이에 대한 결과는 그림 8의 lane 2, 3에서 제시된 것처럼, myosin light chain은 비교적 잘 분리되었지만 myosin heavy chain에 아직도 여전히 존재하고 있음을 나타내었다.

2) Myosin heavy chain의 효소분해에 의한 subfragments의 분리 및 정제

Myosin heavy chain의 단백 가수분해를 위하여 myosin이 가지고 있는 분자적 특성을 이용하여 0.12M NaCl, 0.01M Na-phosphate buffer (pH 7.0)

Table 2. Intra and inter assay variance values for the established ELISA

Ag	No. of determine	Mean S.D. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CV (%)
----	------------------	---------------------------------------	--------

intra assay variance

1	10	0.986 ± 0.01	10.3
50	10	50.125 ± 1.27	2.5
100	10	500.255 ± 0.15	10.0

inter assay variance

500	10	499.25 ± 5.51	11.0
50	10	52.00 ± 3.04	5.9
1	10	1.08 ± 0.08	7.7

Table 3. Percentage of recovery test

added amount ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	expected value ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	observed value ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Recovery (%)	Bias (%)
500	550	590	107	+7
50	100	102	102	+2
1	51	49	94	-4
mean			101.7	+1.7

($p < 0.05$)

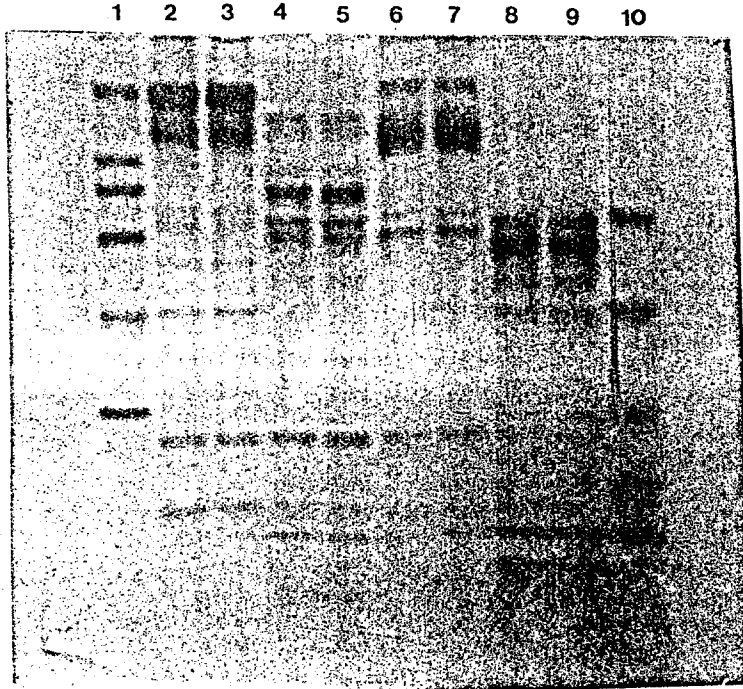


Fig. 8. SDS-PAGE(5~15% gradient polyacrylamide) of myosin digested by α -chymotrypsin

1 : Hight molecular weight marker standard, 10 : Low molecular marker standard,
 1, 2 : pre-enzyme treatment, 4, 5 : after 1st enzyme treatment (S-1 part),
 6, 7 : after enzyme treatment (myosin rod part), 8, 9 : 2nd enzyme treatment.

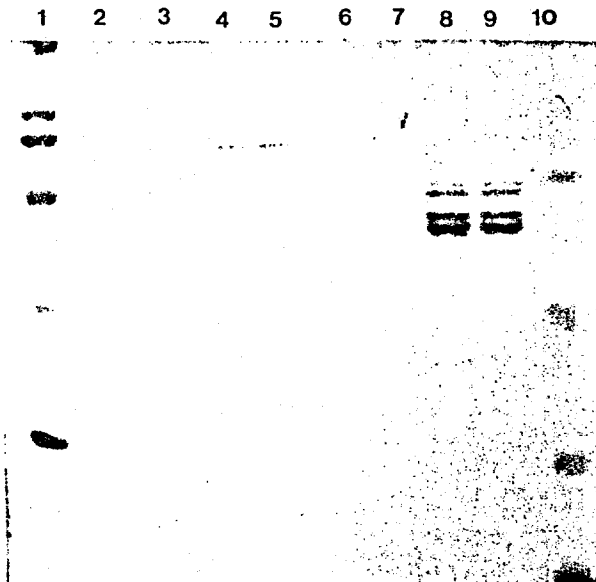


Fig. 9. SDS-PAGE(10% gradient polyacrylamide) of myosin subfragment

1 : Hight molecular weight marker standard, 10 : Low molecular marker standard,
 4, 5 : S-1 part (MW : 90,000 dalton), 6, 7 : LMM part (MW : 56,000 & 59,000 dalton)

에서 침전시켰다. 침전된 myosin(synthetic myosin)에 α -chymotrypsin을 작용시켜 heavy meromyosin인 S-1과 myosin rod 부분으로 가수분해하였다(그림 8 lane 4, 5와 lane 6, 7). 남겨진 myosin rod를 다시 이온강도가 1인 고염용액(0.6M NaCl, 0.01M Na-phosphate, pH 7.0)에 녹여 α -chymotrypsin으로 가수분해하였을 때, heavy meromyosin S-2와 light meromyosin(LMM)을 얻을 수 있었다(그림 8 lane 7, 8). 가수분해로 생성된 myosin subfragments들은 DEAE cellulose ion exchange chromatography를 이용하여 myosin head인 S-1을 분리하였으며, S-2와 LMM은 약이온의 강도에서 침전하는 LMM의 특성을 이용하여 원심분리하여 S-2로부터 분리한 후, 고 이온강도의 염용액에 녹여 Sephadex G-100 gel filtration에 의해 분리 정제하였다(그림 9 lane 4, 5와 8, 9). 분리된 S-1과 LMM의 subfragments의 분자량은 각각 90,000 Dalton과 56,000~59,000 Dalton인 것으로 확인하였으며, LMM은 dimer로 존재한다는 것을 알 수 있었다.

3) Myosin subfragments에 대한 항체의 생산 및 정제

앞에서 분리 정제된 myosin head 부분인 S-1과 α -chymotrypsin에 의해 좀더 가수분해된 산물인 LMM에 대한 각각의 항체를 얻기 위하여 앞서의 myosin 분자에 대한 항체생산 방법에 준하여 항혈청을 생산하였으며, 그 형성은 indirect ELISA법에 의하여 확인하였다. 항혈청으로부터 Protein A High Trap affinity chromatography를 이용하여 anti-S-1 IgG와 anti-LMM IgG를 분리 정제하였다.

4) Myosin 항원에 대한 subfragments 항체의 역가 측정

Myosin을 coating($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)하고 같은 농도로 준비된 표준 myosin 용액($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) 사이에서 경합적으로 반응시켰을 경우 반응값이 50%를 나타냈을 때의 희석농도를 항원과 항체의 분석 최적농도로 결정하였다(그림 10). Indirect ELISA법으로 얻은 결과를 볼 때, 최적 조건의 항체 고정화 농도는 anti-S-1 IgG와 anti-LMM IgG의 희석배수가 1:5000 ($0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$)이었다. 2차 항체의 희석농도는 1:20,000으로 사용하는 것이 분석의 최적조

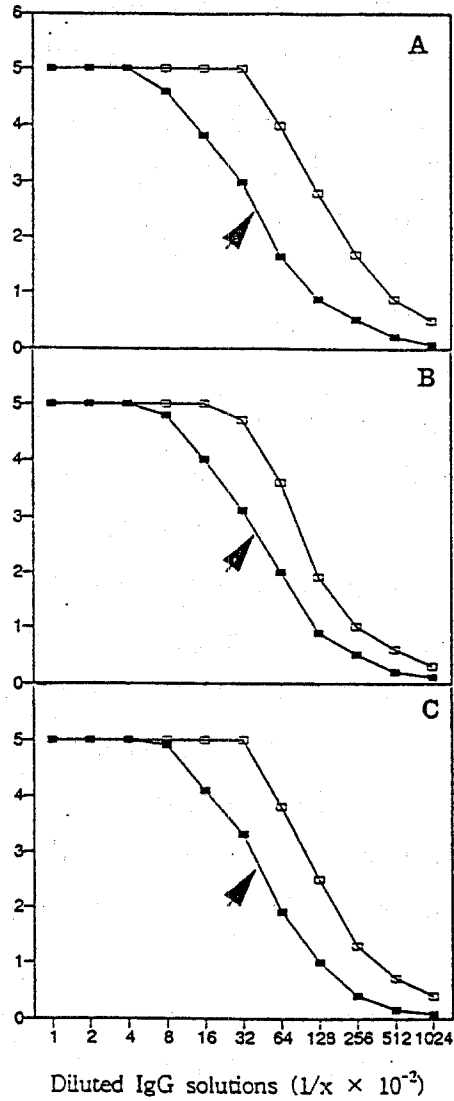


Fig. 10. Determination of the optimal concentration of primary IgGs and secondary Ab (Goat anti-rabbit IgG) conjugated HRP (1:10,000 dilution(□), 1:20,000 dilution(■)) by established ELISA procedure

건인 것으로 판단되었다($p < 0.05$). 이 값은 Gonzalez 등(1996)이 사용한 복합클론 항체의 희석 농도 1/500보다 열배 높은 값이다. Martin 등(1991)은 이종 단백질의 혼입여부를 조사하기 위해 개발한 sandwich ELISA(immunocapture 법)에서 단일클론 항체를 1/1000 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)으로 희석하여 사용하였고, capture antibody를 사용한 Sargeant(1993)는 1/500 ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$)의 항체 희석 농도를 사용하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 항체의 역가는 양호한 것으로 판단되었다.

5) 표준곡선의 작성

위에서 얻은 결과를 기초로 하여 항원과 항체의 농도를 고정하였을 때 표준항원의 농도를 $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 일정하게 희석하여 항체용액이 coating된 항원과 경합적으로 반응하는 값을 구하였다. 이때 normal serum을 blank(NSB)로 사용하였고, 표준항원을 넣지 않았을 때의 값을 반응의 100%로 보아 이에 대해 각 농도에 대한 반응값(BT/BMax)을 백분율로 나타내었을 경우 각각 일정한 형태의 곡선을 나타내었다. 이 곡선을 standard curve로 하여 각 항원을 정량하는데 사용하였다(그림 11). 각각의 곡선에서 최적 반응범위는 $4 \sim 125 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, 검출한계는 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다($p < 0.05$). Myosin에 대한 각 항체를 이용한 표준곡선에서 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 검출 한계는 Dincer 등(1987)이 보고한 감도와 같게 나타난 것이었다.

6) 각 항체의 교차결합도 및 회수율 검사 (확립된 ELISA의 평가)

생산된 anti-S-1 IgG와 LMM, 그리고 anti-LMM과 S-1사이의 교차결합도는 표 4와 같다. S-1을 항원으로 하고 anti-LMM IgG를 항체로 하였을 경우 10.3%의 교차결합도를 보였고, S-3를 항원으로 하고 anti-S-1 IgG를 항체로 하였을 경우 8.5%의 교차결합도를 보여($p < 0.01$), 매우 특이성이 높은 것으로 판단되었다. 또한 앞서의 확립된 방법에 의한 각각의 subfragments에 대한 ELISA법의 정확성과 우수성을 검증하기 위하여 실시한 회수율 측정에서도 S-1과 S-3의 평균 회수율은 102.87% 및 105.00%로 매우 우수하였

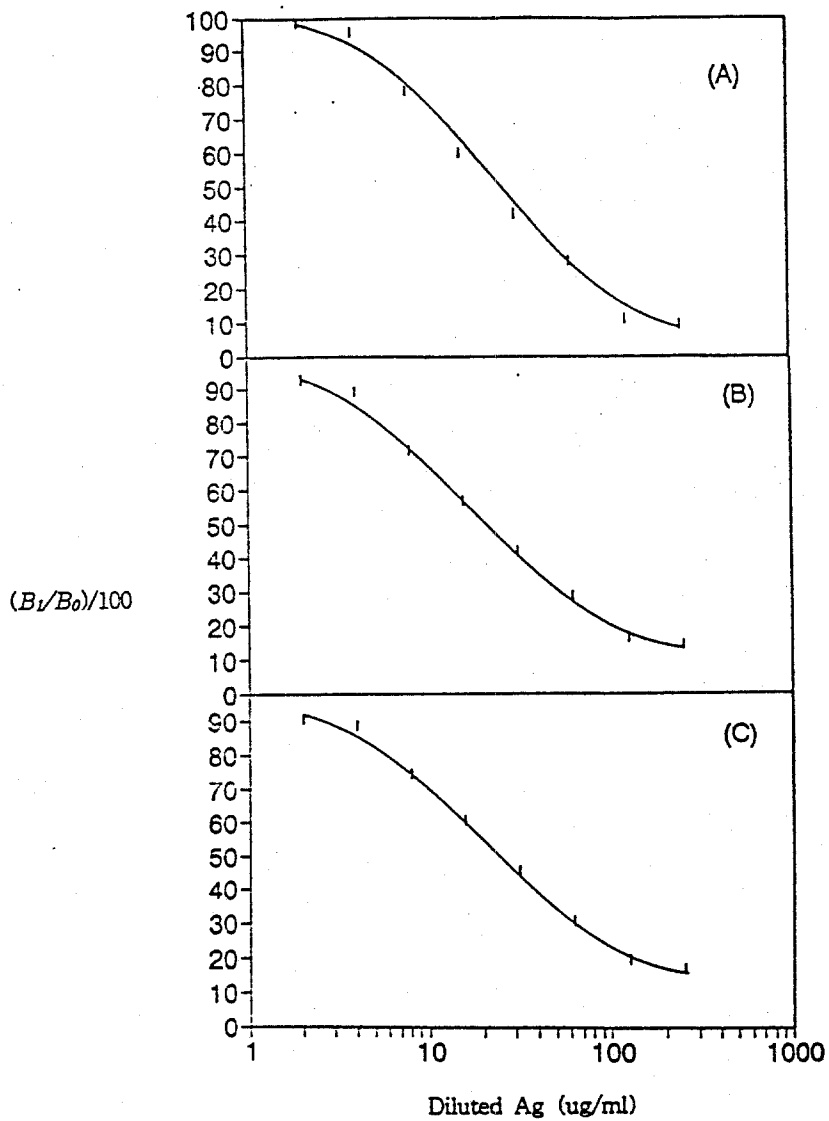


Fig. 11. Standard curves of anti-myosin(A), anti-S-1(B) and anti-LMM IgG(C) for quantification of myosin and monitoring of the denaturation of myosin by frozen treatment

음을 확인하였다(표 5, $p < 0.05$).

다. 우육의 냉장 및 동결처리에 따른 변성도 측정

1) 동결저장에 의한 myosin 및 그 subfragments의 변성도 측정

가) Drip loss의 변화

시료를 채취하기 전에 삼출된 drip(thaw-drip)의 양을 무게(g)로 측정하였다. 동결육의 저장기간에 따른 drip loss는 각 온도대에서 뚜렷하게 차이를 보이고 있으며, $-20^{\circ}\text{C} > -10^{\circ}\text{C} > -50^{\circ}\text{C} > -80^{\circ}\text{C}$ 의 순으로 높은 수준을 나타내었다(표 6). 모든 온도대에서 3개월까지는 급격한 증가를 나타내었으나, 5개월에서는 비슷한 수준을 유지하였고, 6개월째에는 drip의 손실량이 감소하였다. -10°C 에서는 3개월째 6.22%로 최고치를 나타냈으며, 이후로는 비슷한 수준을 유지하다가 6개월째 4.36%까지 감소하였다.

Table 4. Cross reactivity test between S-1 and LMM (%)

Antigen	anti S-1 IgG	anti-LMM IgG
S-1	100	10.3
LMM-3	8.6	100

($p < 0.01$)

Table 5. Recovery test of S-1 and LMM

Ag	added amount (ug/ml)	expected amount (ug/ml)	detected amount (ug/ml)	recovery (%)	Bias (%)
S-1	100	110	115	104.54	+4.54
	10	20	19	95.00	-5.00
	1	11	12	109.09	+9.09
	mean			102.87	+2.87
LMM	100	110	120	109.09	+9.09
	10	20	23	115.00	+15.00
	1	11	10	90.91	-9.09
	mean			105.00	+5.00

(p<0.01)

Table 6. Drip losses of beef slice during different frozen storage temperature (%)

Temp. (°C)	1 (month)	2	3	4	5	6	mean ^a
-10	3.29	2.66	6.22	5.44	5.25	4.26	4.53
-20	3.14	2.53	6.75	5.96	6.25	3.50	4.68
-50	1.34	2.00	5.86	4.82	5.87	3.95	3.97
-80	1.13	1.98	4.28	4.82	4.51	2.63	3.22

^a The data were subjected with five replicates (p<0.05)

-20℃에서도 3개월째 6.75%로 최고치를 나타냈으며, 6개월째 3.50%까지 감소하였다. -50℃에서는 3개월째 5.86%를 나타냈으며, 6개월째에는 3.95%를 나타내었다. -80℃에서는 4개월째 4.82%로 최고치를 나타냈으며, 6개월째 2.63%까지 감소하였다 ($p < 0.05$).

나) 단백질 용해성의 변화

동결 저장 기간에 따른 용해성의 변화는 저장온도에 따라 다르게 나타났다. -10℃에서 저장된 우육의 용해성 변화는 control과 비교하였을 때 2개월까지는 control보다 높게 나타났으나, 그 후 감소하기 시작하여 저장 6개월째에는 88.81%의 용해성을 나타냈다 (표 7).

Table 7. Changes of MPS of beef slices during different frozen storage temperature (mg/mL, %)

Temp. (℃)	0	1 (month)	2	3	4	5	6
-10	2.86	3.28	3.13	2.81	2.65	2.55	2.54
	100 ^a	114.69	109.44	98.25	92.66	89.16	88.81
-20	3.17	3.46	3.64	3.58	3.50	3.26	2.89
	100 ^a	109.15	114.83	112.93	111.46	102.84	91.17
-50	3.09	3.47	3.69	3.65	3.54	3.29	3.14
	100 ^a	112.30	119.42	118.12	114.56	106.47	101.62
-80	3.14	3.39	3.71	3.47	3.50	3.43	2.81
	100 ^a	107.96	118.15	110.51	111.46	109.23	89.49

^a These values were calculated in the percentage of results of each treatments compared to control (fresh beef) ($p < 0.05$).

-20℃에서 저장된 처리구의 용해성은 저장기간 2개월을 기준으로 증가하다가 감소하는 경향을 보이고 있으며, 6개월부터는 control보다 낮게 나타났고, 저장 2개월째에 control보다 14.83%까지 더 높은 용해성을 보였다. -50℃의 처리구는 저장기간 6개월까지 control보다 더 높은 용해성을 보여주었으며, 최고 19.42% 더 높은 값을 나타냈다. -80℃의 처리구는 6개월째 89.49%의 용해성을 보였고, 저장기간 2개월째 최고 18.15%의 더 높은 용해성을 나타냈다. 각 온도대에 저장한 경우 모두 증가하였다가 감소하는 경향을 보이고 있으며, 저장온도에 따른 차이를 보이고 있다. 그러나 -20℃와 -80℃에서 저장된 처리구에서는 거의 유사한 결과를 나타냈다. 각각의 동결저장온도에 따른 단백질 용해성을 비교하면 -50℃에 저장된 우육의 myofibrillar proteins의 용해성이 더 높은 것으로 판단되며, -10℃에서 저장된 처리구가 가장 낮은 것으로 판단되었다.

다) Myosin 분자의 면역반응성 (immunoreactivity) 의 변화

Myosin 분자의 동결저장에 따른 변화는 저장기간이 경과됨에 따라 control과 비교하였을 때 점차 감소하는 경향을 보여주었다(표 8). Myosin에 대한 면역반응도는 온도별 처리구에 따라 조금씩 차이를 나타냈으며, 각 온도에서 저장된 sliced beef cuts의 검출량은 저장 1개월까지는 두드러진 변화는 없었다. 그러나 저장 2개월부터 검출량이 감소되기 시작하였으며 온도별 처리구간의 차이를 나타내었다. -20℃에서 저장된 처리구가 32.46%의 가장 심한 차이를 나타내었고, -50℃의 처리구는 15.64%의 감소를 나타내었다($p < 0.05$). 단백질 용해성의 변화와 비교하였을 경우 저장 6개월째 -10℃의 처리구에서 11.19%의 용해성 감소를 나타냈으나, 이 용액에 녹아있는 myosin 분자에 대한 항체의 인식은 ELISA의 반응에서 control과 비교하였을 때 단지 32.67%만을 인식할 수 있는 것으로 나타났다. -10℃와 -20℃에서는 6개월째에 31.0%와 31.4%의 감소를 보였고, -80℃는 34%, -50℃에서는 49%로 나타났다. -20℃에서 저장된 처리구에서의 변성정도가 가장 큰 것으로 판단되었고, -50℃의 처리구가 가장 적게 변성되는

Table 8. The changes of immunoreactivity of each Ab with myosin molecules extracted from beef slices during different frozen storage temperature

		(%)						
Ag	Temp (°C)	C ^a (fresh)	1 (month)	2	3	4	5	6
	-10	100	103.50 (±4.62)	69.30 (±5.76)	45.00 (±3.84)	36.12 (±4.44)	32.30 (±6.59)	31.02 (±5.73)
Myosin	-20	100	102.50 (±5.79)	62.30 (±3.98)	42.70 (±5.32)	38.20 (±4.36)	32.60 (±3.75)	31.40 (±3.24)
	-50	100	99.00 (±4.02)	79.36 (±3.69)	65.76 (±4.27)	53.21 (±6.50)	51.30 (±6.22)	49.00 (±4.23)
	-80	100	101.7 (±5.03)	69.13 (±4.11)	56.29 (±3.77)	45.07 (±5.59)	39.42 (±6.02)	34.08 (±3.06)
	-10	100	97.10 (±5.78)	95.40 (±6.89)	96.20 (±4.62)	96.75 (±7.23)	98.70 (±3.28)	103.22 (±7.76)
S-1	-20	100	106.43 (±7.64)	110.81 (±4.36)	126.3 (±6.35)	138.41 (±4.72)	152.60 (±8.62)	169.25 (±7.66)
	-50	100	101.80 (±4.70)	102.60 (±7.71)	104.08 (±5.62)	100.30 (±7.89)	98.70 (±4.32)	95.35 (±4.81)
	-80	100	91.92 (±3.53)	88.24 (±4.37)	85.16 (±3.38)	81.90 (±5.26)	77.50 (±5.13)	76.21 (±6.24)
	-10	100	95.03 (±4.93)	67.54 (±7.13)	55.03 (±6.04)	47.00 (±3.72)	42.20 (±3.28)	32.67 (±4.25)
LMI	-20	100	103.79 (±3.72)	73.21 (±4.52)	58.30 (±5.03)	45.60 (±5.67)	37.81 (±3.06)	32.20 (±6.25)
	-50	100	95.40 (±5.21)	84.36 (±3.62)	65.22 (±4.66)	59.70 (±3.78)	54.42 (±3.22)	51.50 (±4.89)
	-80	100	82.60 (±4.92)	69.54 (±5.62)	53.75 (±4.68)	43.09 (±3.33)	35.85 (±4.07)	28.96 (±2.72)

^a Control (fresh beef slices) (p<0.05)

것으로 나타났다. 또한 myosin 농도의 변성을 단백질농도의 변화와 비교하여 보았을 때(그림 12), protein 용해성의 변화와는 어떠한 상관관계를 나타내지 않음을 나타내었다.

라) Myosin head(S-1) fragment의 면역반응성(immunoreactivity)의 변화

Myosin의 subfragments에 대한 변성도 조사에서 S-1은 myosin 분자와는 다른 형태의 매우 특이한 결과를 나타냈다(표 8). 동결저장 중의 S-1의 변화는 -10°C 와 -50°C 에서는 control과 비교하였을 때 차이가 발견되지 않았지만, -80°C 의 처리구에서는 검출량이 약하게 감소하여 6개월째 23.29%의 감소량을 나타냈다($p < 0.05$). 그러나 -20°C 의 처리구는 저장 6개월째 S-1의 검출량을 control과 비교하였을 때 약 70%까지 증가하는 경향을 나타냈고($p < 0.05$), 감소되는 것은 관찰되지 않았다.

마) Light meromyosin (LMM) fragment의 면역반응성(immunoreactivity)의 변화

LMM의 동결저장 중의 변화는 두드러지게 나타났다(표 8). 저장기간에 따른 변화는 모든 처리구에서 비슷한 경향을 보이고 있으며 저장기간이 길어질수록 myosin 분자의 면역반응성과 유사한 경향을 보여주었다(그림 13). LMM의 변화는 동결이 시작되면서 진행되는 것으로 보였고, -20°C 의 처리구에서 가장 심하게 나타났다. -10°C 와 -80°C 의 처리구는 거의 유사한 감소 추세를 보였고, 6개월 후의 검출량은 32.67%와 28.96%를 나타냈다($p < 0.05$). 그러나 -50°C 의 처리구는 49.5%의 검출을 나타냈다($p < 0.05$). 동결저장 중의 변성이 주요하게 myosin의 rod 측, light meromyosin(LMM) 부분에서 발생되고 있다는 것을 보여주었다.

2) 해동 및 냉동 반복처리에 의한 변성도 측정

가) Drip loss의 변화

해동과 냉동을 반복 처리한 실험구에서는 모든 온도대에서 6개월까지 계속적으로 증가하는 경향을 보여주었다(표 9). 여기에서 drip의 양은

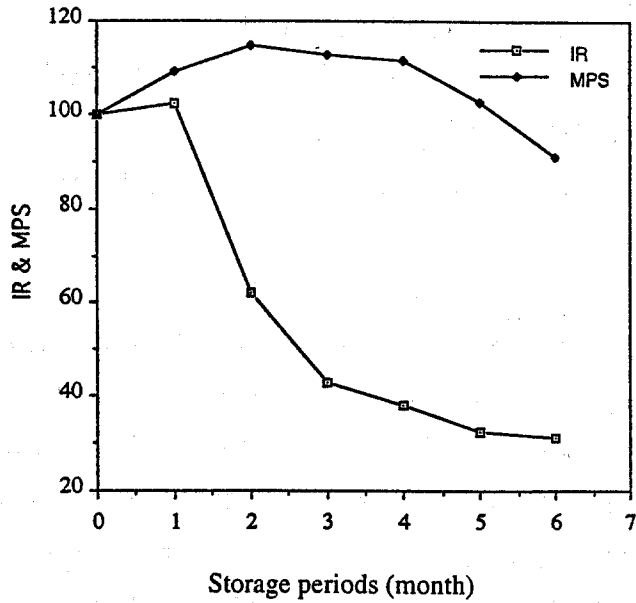


Fig. 12. The comparison of myofibrillar protein solubility(MPS) with immunoreactivity(IR) of anti-myosin IgG for myosin molecules extracted from beef slices frozen and stored at -20°C

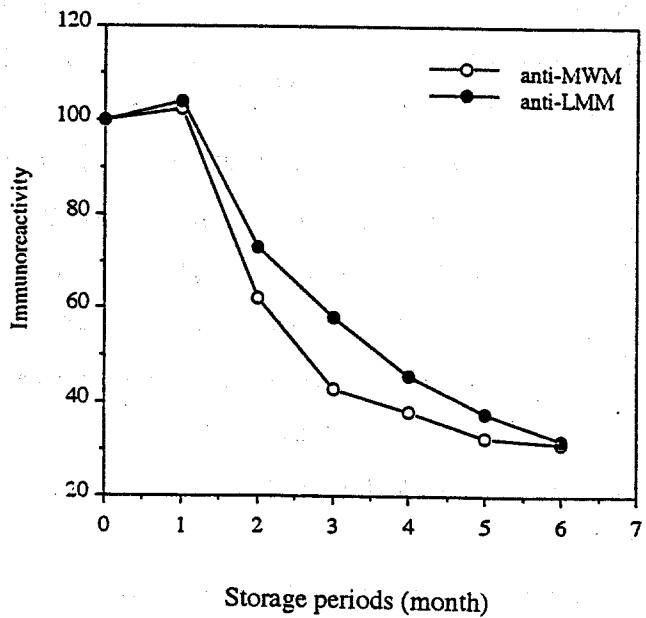


Fig. 13. The comparison of immunoreactivity with anti-myosin IgG and anti-LMM IgG with myosin molecules extract from beef slices frozen and stored at -20°C

해동횟수에 의해 삼출된 양을 누적하여 계산한 것이다. 각 온도대에서의 drip의 양은 -20℃에서 29.16%의 가장 높은 값을 나타내었고, -10℃ > -50℃ > -80℃의 순으로 많은 drip을 삼출하였다. 6회 해동 후에는 모든 처리구에서 21% 이상의 중량 손실을 가져왔고, -20℃의 처리구에서 29.16%의 가장 높은 손실을 나타냈다(p<0.05).

Table. 9. Drip losses of thawed beef cuts by repeated freezing-thawing treatment

(%)

Temp. (°C)	1 (month)	2	3	4	5	6	mean ^a
-10	6.14	4.87	3.41	6.24	3.52	2.44	4.43
	6.14	11.01	14.42	20.66	24.18	26.62 ^b	
-20	6.81	6.79	3.34	4.29	4.80	3.13	4.86
	6.81	13.60	16.94	21.23	26.03	29.16 ^b	
-50	3.77	5.64	5.25	5.03	3.52	2.06	4.21
	3.77	9.41	14.66	19.69	23.21	25.27 ^b	
-80	2.44	6.74	3.56	2.58	3.76	2.43	3.58
	2.44	9.18	12.74	15.32	19.08	21.51 ^b	

^a The data were obtained from five replicates.

^b The sum of drip losses were expressed as weight losses of each treatments occurred by re-thawing (p<0.05).

나) 단백질 용해성의 변화

해동과 냉동을 반복한 처리구에서는 동결기간에 의한 처리구와는 확연히 다른 결과를 보여주었다(그림 14). 표 10에서 볼 수 있듯이 용해성의 감소가 두드러지게 보이고 있으며 각 저장 온도별 차이도 심하게 나타났다. -10℃에 저장하면서 검사한 처리구에서 2회 해동에서 약 10%의 감소를 보이고 있으며, 6개월째는 이미 32.08%까지 용해성이 감소되었다 ($p < 0.05$). -20℃ 처리구는 4 회의 해동까지 약 96%의 용해성을 보였다. 그러나 5회, 6회의 해동처리에서 이미 15% 이상의 용해성 감소를 나타냈다 ($p < 0.05$).

Table 10. The changes of MPS of thawed beef cuts by repeated freezing-thawing

Temp. (℃)	C	(mg/ml, %)					
		1 (time)	2	3	4	5	6
-10	2.93	2.68	2.66	2.60	2.36	1.93	1.99
	100 ^a	91.47	90.78	88.73	80.55	65.87	67.92
-20	3.07	2.94	2.97	2.92	2.99	2.59	2.53
	100 ^a	95.77	96.74	95.11	97.39	84.36	82.41
-50	2.42	2.59	2.65	2.61	2.51	2.49	2.32
	100 ^a	107.02	109.50	107.85	103.72	102.89	95.87
-80	2.99	3.19	3.05	3.01	2.95	2.76	2.65
	100 ^a	106.69	102.01	100.69	98.66	92.31	88.63

^a These values were calculated in percentage of the results of treatments compared to control (fresh beef cuts) ($p < 0.05$).

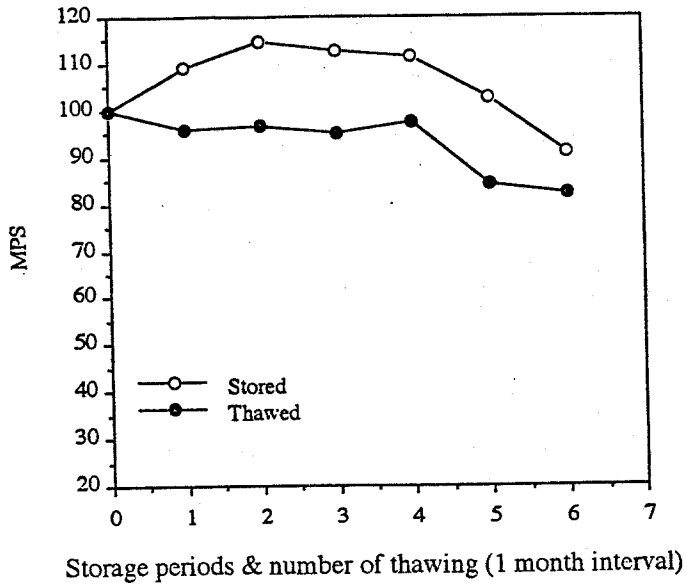


Fig. 14. The comparison of myofibrillar protein solubility(MPS) according to frozen storage time with that of repeated freezing-thawing treatment. Samples were frozen and stored at -20°C

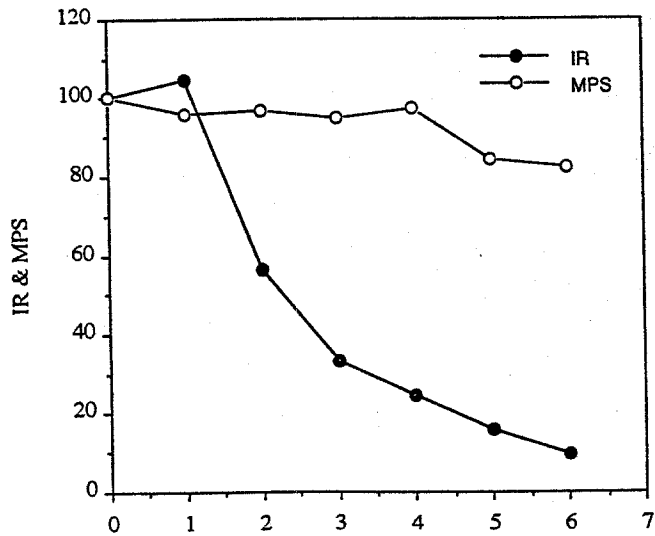


Fig. 15. The comparison of myofibrillar protein solubility(MPS) with immunoreactivity(IR) of anti-myosin IgG for myosin molecules extracted from beef cut by repeated freezing-thawing at -20°C

그러나 -50°C 의 처리구는 저장기간에 따른 용해도의 변화 형태와는 약간의 차이가 있지만 5회 해동까지 control보다 높은 용해성을 보여주었다. -80°C 의 처리구에서는 4회 해동에서 control보다 낮은 값을 보여주었으며 6회 해동에서 11.37%의 용해성 감소를 나타냈다($p < 0.05$). 해동과 냉동에 의한 용해성의 감소는 고온에서 더욱 심하게 나타났다.

다) Myosin 분자의 면역반응성 (immunoreactivity) 의 변화

해동과 냉동을 반복한 처리구에 있어서는 변화가 매우 심한 것으로 나타났다 (표 11). 2회 해동에서 이미 -10°C 와 -20°C 의 처리구는 약 50%까지 myosin의 양이 감소된 것으로 나타났다. 그러나 myofibrillar protein의 농도 변화와 비교하였을때, 처리구들의 농도는 약 91%이상을 나타내었다(그림 15). 3회 해동에서는 -50°C 의 처리구를 제외한 모든 처리구들의 검출값이 단지 33.21%(-20°C)에서 43.6%(-10°C)를 나타내었다. 6회 해동하였을 경우 모든 처리구들은 약 85%이상의 변성을 겪은 것으로 나타났다($p < 0.05$). -10°C 와 -80°C 의 처리구의 변성 정도는 매우 유사한 경향을 보였으며, -20°C 의 처리구가 가장 심한 손상을 받는 것으로 나타났다. 그림 16에서 볼 수 있는 바와 같이 -50°C 의 처리구가 손상을 덜 받는 것으로 보이지만 모든 처리구들의 변성도가 매우 큰 것으로 판단되었으며 3회 해동처리에서는 이미 50% 내외의 변성도를 나타냈다. 이 결과는 myosin이 동결 기간보다는 해동처리에 의해 더 심한 손상을 입는다는 것을 보여주고 있으며(Park 등, 1994), ice recrystallization에 의해 주로 근섬유의 파괴가 일어난다는 사실을 시사하는 것이었다.

라) Myosin head(S-1) fragment의 면역반응성(immunoreactivity) 의 변화

해동과정중에 발생하는 S-1의 변화는 동결기간에 따른 변화와 다른 양상을 보여주었다 (표 11). 모든 처리구들이 다소 차이는 있지만 3회 해동까지 대부분의 처리구에서 반응의 감소를 나타냈다. 그러나 해동 횟수가 증가할수록 다시 반응이 증가하는 것은 재동결 처리에 의해 myosin head

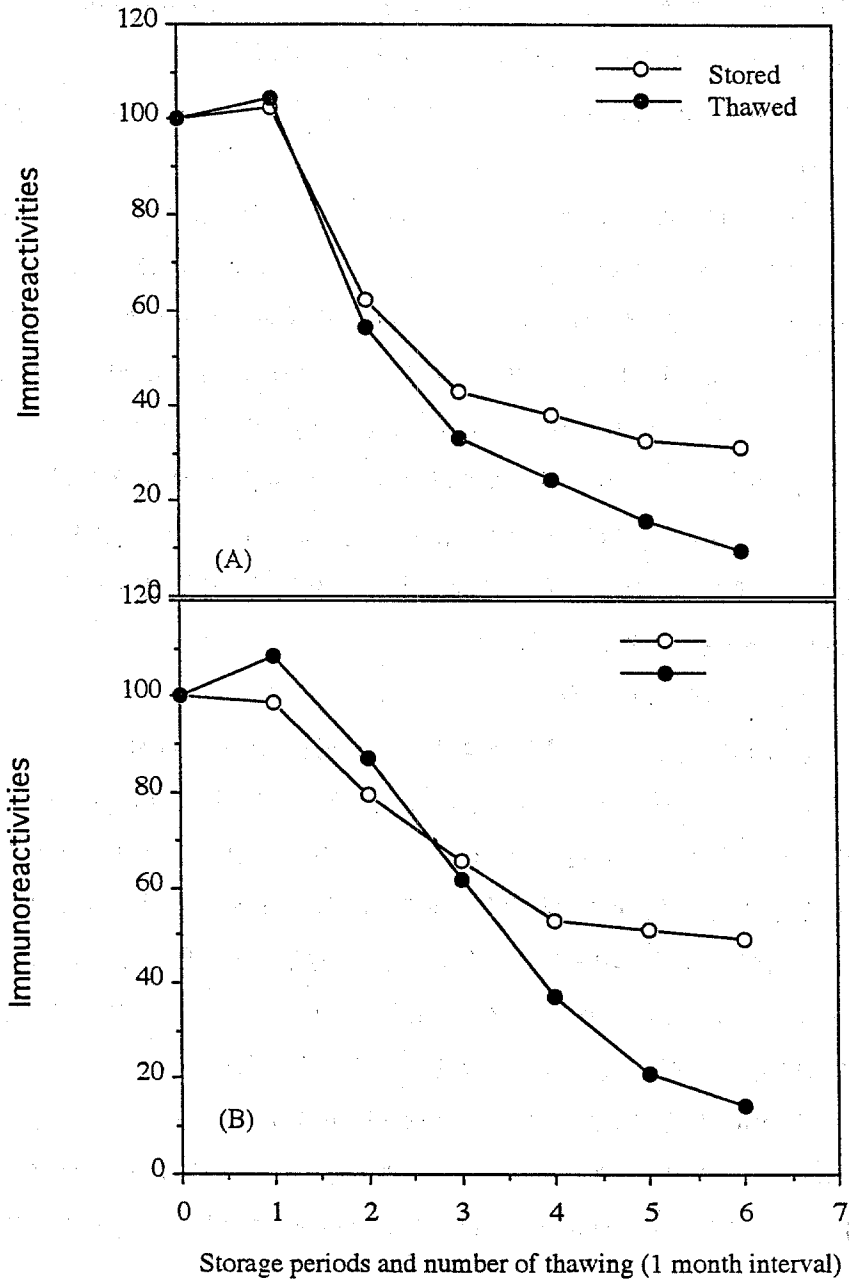


Fig. 16. The comparison of the immunoreactivity changes of myosin molecules according to frozen storage time with that of repeated freezing-thawing treatment. Samples were frozen and stored at -20°C (A) and -50°C (B), respectively.

subfragment가 다른 구조로 refolding되면서 표면에 존재하는 epitope들과의 항체의 인식 정도가 높아졌을 것으로 추정되었다.

마) Light meromyosin(LMM) fragment의 면역반응성(immunoreactivity)의 변화

반복되는 해동 과정 중에 일어나는 변화는 동결기간에 의한 결과와 유사하였지만 좀더 심하게 변성되는 것을 나타냈다(그림 17). 2회 해동에서 이미 -50°C 를 제외한 모든 처리구들이 약 35%이상 감소하였고, -20°C 의 처리구는 50%의 감소를 나타냈다(표 11). Light meromyosin의 반복되는 해동처리에 의한 변성은 고온에서 저장하였을 때 더 많이 발생하는 것으로 나타났다. 즉, -10°C 와 -20°C 의 처리구가 저온 저장된 처리구들보다 약 10~15% 정도 더 많은 변성을 겪는 것을 보였다. Myosin 분자와 같은 경향으로 LMM도 동결에 의해 영향을 받아 분자의 구조가 변하여 항체와의 반응이 떨어지는 것으로 판단되었다.

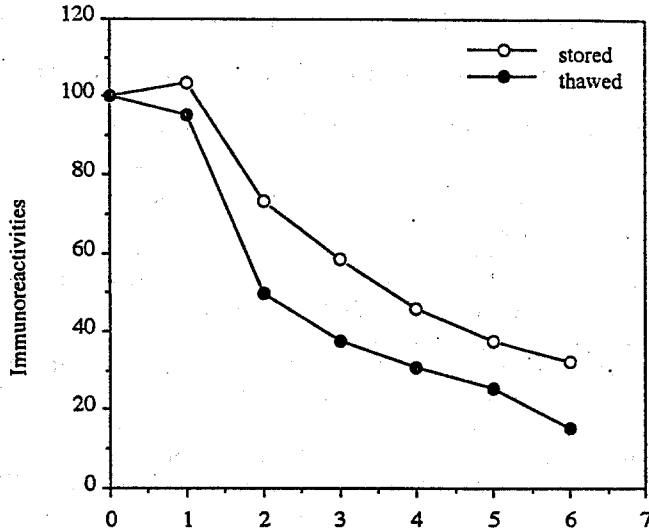
3) 냉장저장에 의한 myosin 분자의 변성도 측정

Myosin의 냉장 저장 중의 변화는 이미 많은 연구 등에서 거의 변화하지 않는 것으로 보고되어왔다. 그러나 우수한 감도인 면역분석법에 대한 적용이 없었으며, 만약 myosin molecules이 저장기간 중 변화한다면 이값이 속성을 마친 수입육의 평가에 작용할 수 있고 또한 본 연구에서 평가할 때 부정적인 결과를 나타낼 수 있기 때문에 냉장육에 대한 실험을 실시하였다. 도축 후 24 시간이 경과한 시료를 통제구로 하여 4°C 에서 15일간 저장하면서 용해성과 myosin의 변화를 측정하였으나, 그림 18에서 보는 바와 같이 어떠한 유의성도 발견되지 않았다($p>0.05$). 이에 따라 냉장에 의한 myosin의 변화를 배제할 수 있기 때문에 본 연구에서 사용한 통제구(24시간 예냉을 거친 식육)를 기준값으로 사용할 수 있다고 판단하였다.

Table 11. The changes of immunoreactivity of each Ab with myosin molecules extracted from thawed beef cuts by repeated freezing-thawing according to storage temperature (%)

Ag	Temp (°C)	C ^a (fresh)	1 (time)	2	3	4	5	6
Myos	-10	100	96.67 (± 4.75)	50.09 (± 3.62)	43.60 (± 5.03)	30.50 (± 3.87)	18.50 (± 4.23)	14.80 (± 5.72)
	-20	100	104.64 (± 6.05)	56.20 (± 4.89)	33.21 (± 5.68)	24.50 (± 5.26)	16.00 (± 5.32)	9.56 (± 4.46)
	-50	100	108.21 (± 5.62)	87.07 (± 4.18)	61.80 (± 4.66)	37.20 (± 5.24)	21.40 (± 3.74)	14.60 (± 4.67)
	-80	100	92.5 (± 7.45)	60.97 (± 4.92)	42.70 (± 2.65)	27.50 (± 3.54)	18.90 (± 4.25)	12.60 (± 3.80)
S-1	-10	100	92.00 (± 8.03)	82.00 (± 4.72)	77.61 (± 3.21)	84.14 (± 4.27)	92.31 (± 5.23)	102.52 (± 5.32)
	-20	100	91.30 (± 4.75)	89.50 (± 7.35)	90.73 (± 4.15)	95.65 (± 3.93)	102.51 (± 4.38)	107.83 (± 4.37)
	-50	100	96.53 (± 5.43)	68.22 (± 6.23)	55.37 (± 3.89)	62.10 (± 3.99)	80.62 (± 4.83)	104.5 (± 3.29)
	-80	100	93.41 (± 4.68)	60.54 (± 2.42)	54.79 (± 4.56)	70.38 (± 3.62)	96.79 (± 7.90)	110.66 (± 3.10)
LAM	-10	100	92.20 (± 5.54)	62.57 (± 6.02)	35.70 (± 3.51)	28.63 (± 2.97)	19.30 (± 3.24)	11.80 (± 2.16)
	-20	100	95.52 (± 5.06)	49.64 (± 3.56)	37.82 (± 4.95)	30.66 (± 3.18)	23.51 (± 4.62)	15.62 (± 4.21)
	-50	100	103.79 (± 3.06)	73.21 (± 3.78)	58.37 (± 5.21)	45.63 (± 4.78)	37.84 (± 4.72)	32.20 (± 2.89)
	-80	100	82.99 (± 5.11)	64.21 (± 4.50)	54.66 (± 4.75)	38.34 (± 2.53)	29.81 (± 5.62)	23.70 (± 4.36)

^a Control(fresh beef slices) (p<0.05)



Storage periods and number of thawing (1 month interval)

Fig. 17. The comparison of the immunoreactivity change of LMM according to frozen storage time with that of repeated freezing-thawing treatment. Samples were frozen and stored at -20°C.

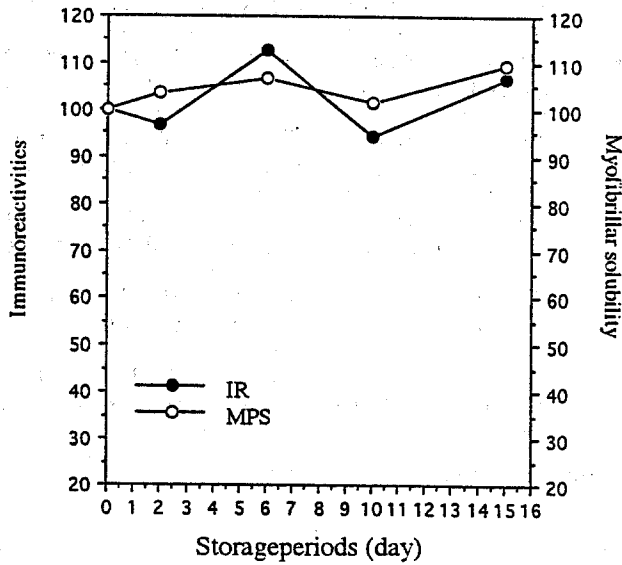


Fig. 18. The changes of immunoreactivity of anti-myosin IgG and myofibrillar protein solubility(MPS) in beef slice during storage time

라. 수입육에 대한 평가

축산물 사업단으로부터 무작위로 40 개체의 *M. semitendinosus*를 구입하여 확립된 분석 방법으로 수입육의 동결 처리 결과를 분석하였다. 일반적으로 수입육은 도축 후 선적되어 일반소매점에서 판매될 때 까지 약 2~3 개월의 유통기간이 필요하다. 대부분 동결 상태로 선적되어 저장되며 이때 일반적인 저장온도는 $-20\sim-30^{\circ}\text{C}$ 사이이다. 지육 상태로 수입된 식육은 국내에서 다시 해동되어 부분육으로 정형되어 다시 동결 저장되는데, 이 부분육이 소매점에서 다시 해동되어 신선육으로 둔갑되기도 한다. 이에 최소한 가공단계에서 2회 이상의 해동과정을 거치며, 만약 부분 포장육으로 수입된 식육 또한 더 긴 저장기간을 냉동상태로 보존되고 소매점에 유통된다. 이에 저장 기간과 해동횟수 등의 조사에서 얻은 값을 수입육에 비교하였을 때, 신선육에 비하여 수입육의 면역반응력이 45%에서 75%사이에서 나타났으며, 시료 중 75%가 55%~65%의 반응값을 나타냈다(그림 19). 이 값을 저장기간의 반응력과 비교하였을 경우 약 3개월 전 후에서 얻은 반응값의 범위에 포함되었다(표 8). 또한 해동 횟수의 비교에서는 적어도 2회 이상의 해동을 거친 상태라고 판단되었다(표 11).

2. 육의 저장중 DNA손상 측정을 위한 Comet assay법의 개발

가. Comet assay법의 확립

1) 근육조직으로부터 핵체의 분리

근육조직으로부터 핵체를 효율적으로 분리하기 위하여 효소를 이용한 방법과 물리적인 방법에 의한 방법 두가지를 사용하였다. 효소적인 방법에서는 collagenase P를 이용하였으며 이 방법에 의해서는 핵체에 상당한 DNA 손상이 있었음 볼 수 있었다(Neutral lysis방법을 이용하였음). 이것은 핵체를 분리하기 위한 단계에서 효소액에 조직을 30분간 담구어 놓게 되는데 이 시간동안 DNA가 손상을 입는 것으로 추정되었다. 따라서 효소로

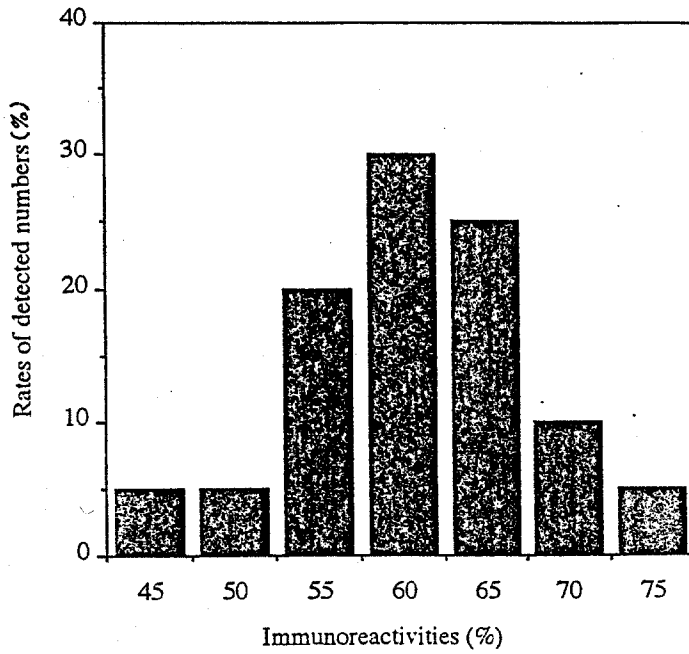


Fig. 19. Pre-evaluation for imported beef cuts(40 individuals). Samples were randomly collected and tested with anti-myosin IgG.

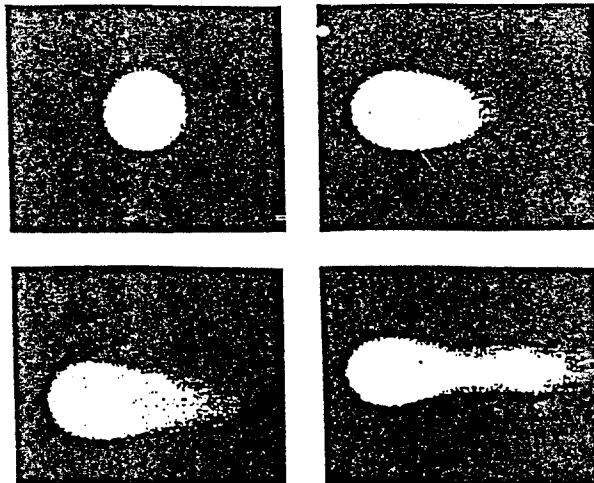


Fig. 20. Grade of DNA migration length

- A. Group 1; $40 \mu\text{m} > L$,
- B. Group 2; $40 \mu\text{m} < L < 70 \mu\text{m}$,
- C. Group 3; $70 \mu\text{m} < L < 100 \mu\text{m}$,
- D. Group 4; $100 \mu\text{m} > L$

핵체를 분리하는 것보다 물리적인 방법을 이용하여 핵체를 분리하는 것이 이 실험의 특성상 나은 방법으로 사료되었다. 한편, 물리적인 방법으로 핵체를 분리하는 방법에 의해 행하여진 실험에 의한 DNA 손상은 전혀 없는 것으로 나타났기 때문에 이 후의 모든 실험에서 근육으로부터 핵체의 추출은 이 방법에 의해 진행되었다.

2) Alkali 및 neutral lysis에 의한 comet image의 비교

일반적으로 Comet analysis에서 분리된 DNA 핵을 전기영동하는 방법으로, neutral lysis 후의 neutral electrophoresis 그리고 alkali lysis 후 alkali electrophoresis 법이 있는데 본 실험에서는 양쪽 조건 (neutral lysis과 neutral buffer 하에서의 전기영동, 그리고 alkali lysis와 alkali buffer 하에서의 전기영동) 과 양쪽조건을 혼합한 조건 (neutral lysis와 alkali buffer 하의 전기영동 및 alkali lysis와 neutral buffer 하에서의 전기영동) 등 4가지 방법을 이용하여 comet 분석을 실시하였다. 첫번째로 neutral lysis와 neutral buffer 하에서의 전기영동의 조건은 comet의 형태 및 그 손상정도에 대한 image가 매우 뚜렷하게 나타났고, alkali lysis와 alkali buffer 하에서의 전기영동 조건에서는 핵이 완전히 붕괴되어 그 comet의 길이가 평가 상한선인 100 μm 를 초과하였다. 그 이유에 대해서는 아직 명확하지는 않으나 확실한 것은 단핵세포와는 달리 근육에 존재하는 다핵세포의 경우, alkali buffer 하에서의 전기영동은 핵의 완전한 붕괴를 가져온다는 것이 분명하였다. 한편 양쪽조건을 혼합한 조건에서도 앞서의 alkali lysis와 alkali buffer하에서의 전기영동에서와 마찬가지로 실험에 의한 심한 DNA 손상현상을 나타내었다. 따라서 본 실험은 가능한 온도를 낮추고 물리적인 조건하에서 핵체를 분리한 후 중성의 조건하에서 실험을 하는 것이 최적 조건임을 확인하고 이후의 모든 실험에 적용하였다. 이 분석 방법에 따라서 얻어진 핵체의 손상정도를 comet 길이로서 4등급으로 나눈 전형적인 근육핵 comet image는 그림 20에 나타내었다.

나. 우육의 이화학적 처리방법에 따른 DNA 손상도 조사

1) 냉장저장에 의한 영향

냉장에 의한 DNA 손상은 표 12에 보여진 것처럼, 3일까지 근육핵내 DNA 손상의 급격한 증가를 나타내다가($p < 0.01$) 3일 이후부터는 완만한 증가세를 나타내었다. 이 결과를 도축 당일의 통제구에 대한 상대적인 손상치(Relative Damage Index, RDI)로 나타내었을 때, 10일까지의 냉장저장에 의해 통제구에 비해 약 60~80% 범위내의 손상 증가를 보여주었다. 한편 측정된 모든 핵들의 DNA 가닥절편의 이동길이를 등급화하여 살펴보았을 때, 이동거리가 40 μm 이하인 (손상이 없다고 간주되는) 핵들이 저장기간이 지남에 따라 점차 분포도의 왼쪽 등급으로부터 DNA 손상을 나타내는 오른쪽 등급으로 이동하는 양상을 보였다(그림 21). 이러한 양상은 측정에 이용된 시료의 핵들의 손상정도가 매우 다양하여 모든 등급에 골고루 분산되고 있음을 드러내었다.

2) 동결기간에 따른 우육의 DNA 손상도의 검사

동결온도 및 기간에 따른 차이는 -20°C 의 냉동고와 -50°C deep freezer에서 진공포장 상태로 동결저장 후 매 15일째마다 시료를 취하여 60일(2개월)까지 측정하였다. 동결에 의한 근육 핵내 DNA의 손상정도는 동결시 발생하는 얼음결정에 의한 부분적인 DNA 손상에 의해서 도축 당일의 결과(0 day)보다 -20°C 와 -50°C 의 처리구에서 10~50% 손상증가를 가져오는 것으로 나타났으며, 13개월 동결처리구에서도 이 정도의 손상을 갖는 것으로 나타났다(표 13, 14). 이 결과를 다시 등급화시킨 결과에서도 냉장기간의 결과와 마찬가지로 도축당일 시료보다 손상은 있지만 전반적으로 모근 등급에 걸쳐 핵들이 분산되어 있음을 보여주었으며 시간이 지날수록 손상의 증가 현상은 발견되지 않았음을 나타내었다(그림 22, 23). 이러한 결과를 비추어 볼 때, 동결기간에 의해서 입는 DNA 손상은 시간이 아니라 동결에 의해서 주로 그 손상이 유도되고 있음이 추정되었다.

Table 12. The changes of the mean DNA migration length and their relative damage index (RDI) in two sources of meat during 4°C storage

Meat sample	Mean tail length (μm) / RDI					
	Control	1 day	3 day	5 day	7 day	10 day
<i>M. semitendinosus</i>	33.5 \pm 4.7	41.1 \pm 4.8	49.5 \pm 5.1*	48.4 \pm 7.8*	51.1 \pm 7.3*	57.8 \pm 11.9*
		1.1 \pm 0.4	1.5 \pm 0.1*	1.5 \pm 0.2*	1.4 \pm 0.5*	1.7 \pm 0.3*
<i>M. Triceps brachii</i>	30.7 \pm 2.6	39.9 \pm 3.7	50.3 \pm 5.2*	54.4 \pm 7.1*	58.3 \pm 7.4*	62.2 \pm 11.5*
		1.3 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2*	1.8 \pm 0.2*	1.6 \pm 0.7*	1.9 \pm 0.3*

($p < 0.05$)

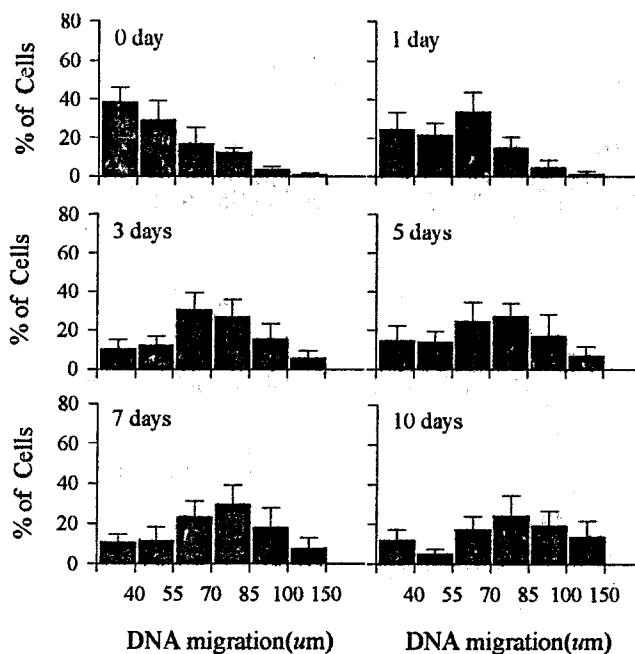


Fig. 21. Distribution of tail length of nuclear DNA isolated from skeletal muscle during refrigeration storage period at 4°C

Table 13. The changes of the mean DNA migration length and their relative damage index (RDI) during -20°C storage in two sources of meat

Meat sample	Mean tail length (μm) / RDI				
	Control	15 day	30 day	45 day	60 day
<i>M. semitendinosus</i>	35.8 \pm 1.4	48.5 \pm 1.8	44.2 \pm 1.1	41.0 \pm 3.0	35.3 \pm 10.2
		1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3
<i>M. Triceps brachii</i>	32.5 \pm 1.4	51.8 \pm 8.3	46.8 \pm 3.6	38.7 \pm 2.4	34.4 \pm 9.3
		1.6 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.0	0.8 \pm 0.1

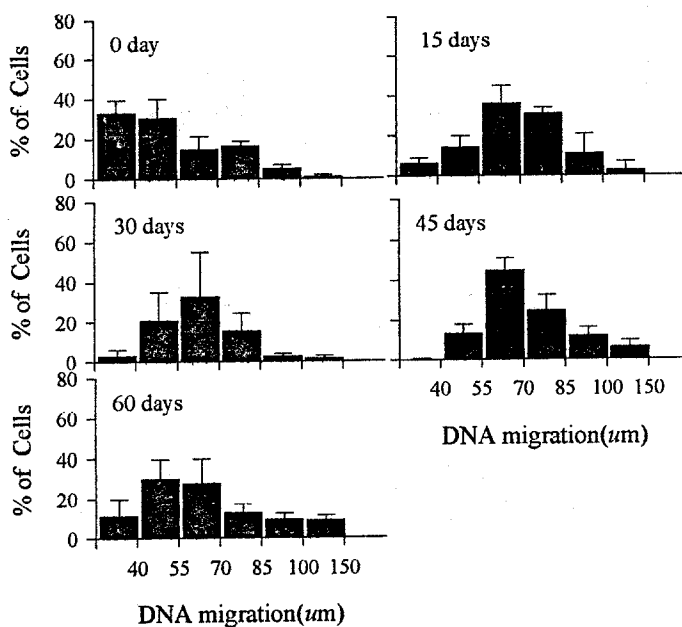


Fig. 22. Distribution of tail length of nuclear DNA isolated from skeletal muscle during freezing storage at -20°C

Table 14. The changes of the mean DNA migration length and their relative damage index (RDI) during -50°C storage in two sources of meat

Meat sample	Mean tail length (μm) / RDI					
	Control	15 day	30 day	45 day	60 day	13 month
<i>M. semitendinosus</i>	35.9 \pm 1.5	47.5 \pm 7.2	39.9 \pm 0.9	42.8 \pm 3.8	41.0 \pm 8.0	48.04 \pm 2.1
		1.3 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1
<i>M. Triceps brachii</i>	32.5 \pm 1.5	46.2 \pm 1.6	39.1 \pm 2.9	46.3 \pm 9.2	38.5 \pm 10.7	50.40 \pm 3.9
		1.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2

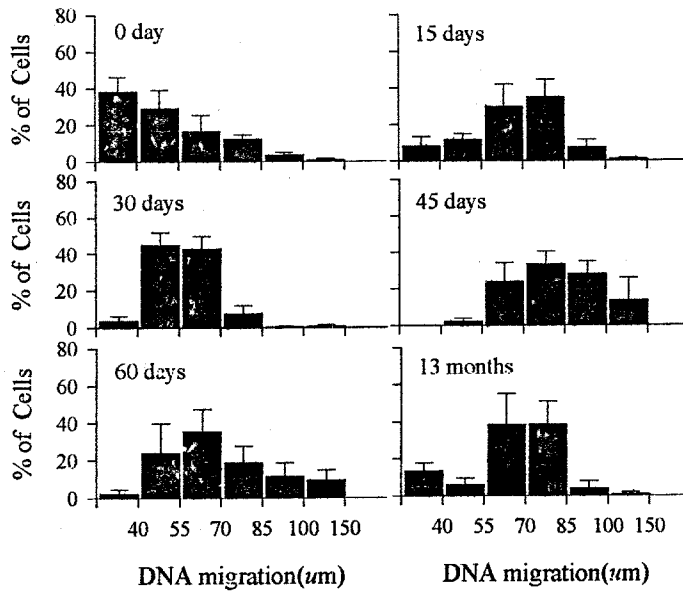


Fig. 23. Distribution of tail length of nuclear DNA isolated from skeletal muscle during freezing storage at -50°C

3) 동결 및 해동 반복처리에 의한 DNA 손상정도의 검사

진공포장된 시료들은 지방이 제거된 lean meat을 두께가 1 cm정도 되도록 정형한 후 진공포장하여 -50℃ deep freezer에서 동결하고, 매 3일마다 시료를 18℃ 유수에서 해동한 것을 반복 1회(1 cycle)로 하여 2, 3, 6회 반복 동결해동 처리구에서 나타나는 손상의 정도와 비교 측정하였다. 동결해동 1회는 비처리 신선육의 평균 근육 핵내 DNA 손상정도와 유사하였으며 동결해동 2회부터는 그 손상의 정도가 점차 증가하였고, 3회 이상의 처리구에서는 200% 이상의 손상이 나타났다(표 15). 이 또한 분포도로 살펴보면 동결해동 2회까지는 손상의 증가를 나타내는 정도가 냉장육과 동결처리육과 다르지 않음을 알 수 있었고 3회 이상부터는 특정 등급(tail length 85 μm 이상)의 비율이 증가되고 있음을 나타내었다(그림 24).

4) 방사선 조사량에 따른 DNA 손상정도의 검사

방사선 조사에 따라서 손상정도는 3 kGy까지 급격히 증가하다 그 이후 그 손상정도가 유지되고 있음을 나타내었다(표 16). 1 kGy 조사구에서 손상정도는 비조사육보다 50~60%로 더 증가하고 있었지만, 이 결과는 냉장육이나 동결육 그리고 동결해동 2회 반복 처리구에서 얻어진 결과와 대동소이한 것으로 RDI 수치만으로 구별할 수는 없었다. 그러나 분포도로 나타내어 확인한 결과, 앞서의 다른 조건에서의 결과와는 다른, 상당히 특이한 결과를 얻을 수 있었다. 즉, 1 kGy의 조사로 인해서 특정 등급(tail length 85 μm 이상)이 차지하는 비율이 다른 등급보다 월등하게 증가하고 있음을 나타내었으며(평균 50%이상), 조사량이 증가할수록 이 등급을 차지하는 손상입은 핵들의 비율은 counting된 세포핵의 평균 약 90% 정도를 차지하고 있음을 알 수 있었다(그림 25).

5) 부위별에 따른 손상정도의 비교

또한 부위별에 따른 냉장기간, 동결기간, 동결 해동 반복 및 방사선 처리에 대한 손상도 차는 약간 존재하였으나 유의적으로는 인정되지 않았다(그림 26).

Table 15. Changes of the mean DNA migration and their relative damage index(RDI) by freezing-thawing cycle(F/T cycle) in two sources of meat

Meat sample	Mean tail length (μm) / RDI				
	Control	1 cycle	2 cycle	3 cycle	6 cycle
<i>M. semitendinosus</i>	34.5 \pm 5.7	33.8 \pm 5.0	51.0 \pm 2.1*	58.6 \pm 15.8*	83.8 \pm 7.0*
		1.0 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2*	1.9 \pm 0.8*	3.0 \pm 0.8*
<i>M. Triceps brachii</i>	30.4 \pm 2.7	34.3 \pm 4.6	50.2 \pm 5.8*	67.4 \pm 10.3*	91.8 \pm 6.7*
		1.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1*	2.3 \pm 0.4*	3.2 \pm 0.1*

(p<0.05)

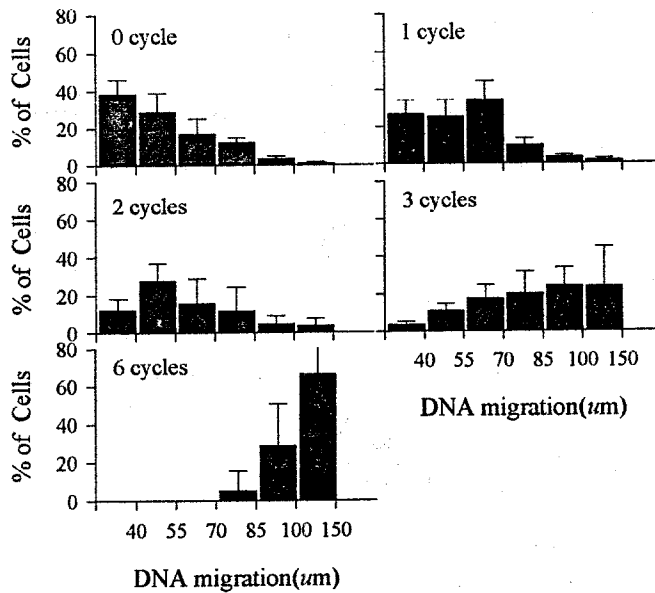


Fig. 24. Distribution of tail length of nuclear DNA isolated from skeletal muscle by the treatment of freezing-thawing cycle

Table 16. The changes of the mean DNA migration length and their relative damage index (RDI) in two sources of meat by the treatment of ^{60}Co irradiation

Meat sample	Mean tail length (μm) / RDI				
	0 kGy	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
<i>M. semitendinosus</i>	38.4 \pm 7.6	60.9 \pm 6.2	75.0 \pm 5.8	79.5 \pm 5.0	84.2 \pm 4.1
		1.6 \pm 0.3	2.0 \pm 0.4	2.1 \pm 0.5	2.3 \pm 0.6
<i>M. Triceps brachii</i>	48.2 \pm 10.0	70.6 \pm 18.4	84.3 \pm 20.3	88.8 \pm 14.6	84.9 \pm 16.9
		1.5 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	1.8 \pm 0.3

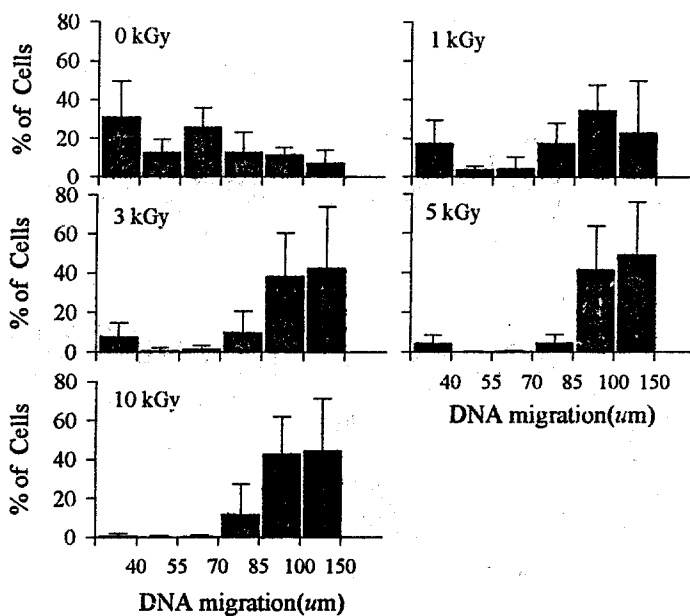


Fig. 25. Distribution of tail length of nuclear DNA isolated from ^{60}Co irradiated skeletal muscle

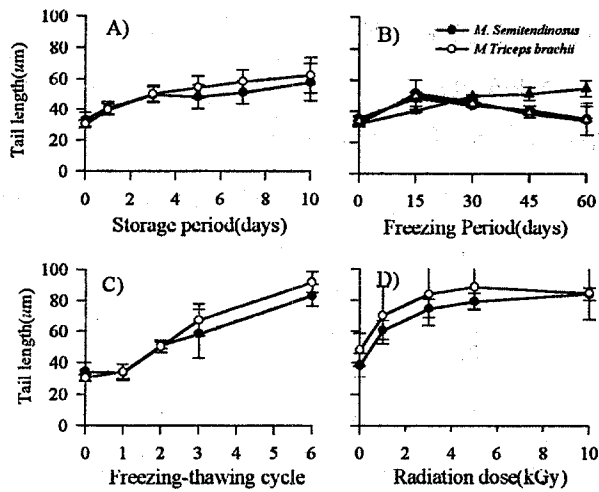


Fig. 26. Difference between mean tail length of nuclear DNA isolated from two sort of muscle A) during refrigeration storage, B) freezing period(●○, -20°C; ▲△,-50°C) and C) by the treatment of freezing-thawing cycle, D) irradiation

다. 수입육과의 비교

부산지역에서 현재 학교급식용으로 판매되고 있는 수입 냉동육 20개체(우둔 10개체, 사태 10개체)를 부산광역시 소재 (주)제일축산으로부터 구입하여 실험에 이용하였으며, 대조구로서는 현재 포항시내에서 판매되고 있는 냉장 한우육 15개체(우둔 5개체, 사태 10개체)를 각 정육점으로부터 구입하여 실험에 이용하였다. 표 17과 18에서 나타낸 바와 같이, 수입육의 경우는 mean tail length 값으로 비교할 때 한우육보다는 손상도가 크게 나타남을 알 수 있었다. 그러나 개별적인 수입육 시료에 대해서는 mean tail length 값으로는 한우육과 구별할 수 없는 경우가 다수 존재하였다. 따라서 tail length로 구분한 손상등급별로 핵들의 분포정도를 비교함으로써 수입육과 한우육을 유의성있게 분별할 수 있음을 알 수 있었다. 즉, 핵들의 분포에 있어 40 μm 에서 100 μm 에 이르는 여러 손상등급에서는 두 시료가 유사한 분포를 나타냈으나, 40 μm 이하의 손상이 없는 등급에서는 한우육에 비해 수입육이 훨씬 적은 분포를 보여주었고, 100 μm 이상의 심한 손상을 입은 등급에서는 수입육의 경우가 월등히 많은 분포를 나타내었다. 따라서 Comet assay를 수입육 판별에 이용함에 있어서는 mean tail length의 단순한 비교보다는 양쪽 극단의 손상등급에 대한 분포도를 비교함으로써 유의성있게 판별을 수행할 수 있는 것으로 판단되었다.

Table 17. The mean values of s DNA migration length in two sources of Hanwoo and imported beef

Meat sample	Mean tail length (μm)	
	Hanwoo	Imported beef
<i>M. Semitendinosus</i>	38.17 \pm 1.02	47.00 \pm 4.51
<i>M. Triceps brachii</i>	35.80 \pm 1.71	49.40 \pm 5.28

Table 18. Percentages of cells(nuclear DNA) distributed to each tail length group in Hanwoo and imported beef muscle

Tail length(μm)	%	
	Hanwoo	Imported beef
< 40	16.9 \pm 16.8	6.4 \pm 7.3
40~55	32.0 \pm 13.3	32.6 \pm 10.0
55~70	26.8 \pm 12.0	33.3 \pm 11.6
70~85	12.7 \pm 8.5	16.0 \pm 8.8
85~100	4.1 \pm 5.5	5.3 \pm 3.4
> 100	2.6 \pm 4.8	11.3 \pm 11.4

제4절 참고문헌

- Cerda, H. (1993) Analysis of DNA in fresh meat, Poultry and fish. In: "Changes DNA for the detection of irradiated food" Strasburg 25-26.
- Cerda, H., Hofsten B.V. and Johanson, K.J. (1991) Identification of Irradiated Food by Microelectrophoresis of DNA from Single Cells, in : M. Leonardi, J. J. Bellisaro and J. Raffi (Eds.), Workshop on Recent Advances of New Methods of Detection of Irradiated Food, Ancona, 24-26 September, Brussels, Commission of the European Communities.
- Chen, M.T., Yang, W.D. and Guo, S.L. (1988) Differentiation between fresh beef and thawed frozen beef. Meat Sci., 24:223-226.
- Choi, S. (1991) A surimi like material made from beef and pork and a novel protease in bovine and porcine skeletal muscle. Ph. D. theses., University of Illinois, USA.
- Delincee, H. (1993) Detection of the Irradiation Treatment of Foods Using Micro Gel Electrophoresis of DNA, In "New Developments in Food, Feed and Waste Irradiation" (Schreiber, G.A., Helle, N., Bögl, K.W., eds.), Bericht des Instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes. SozEp Heft 16 (1993) (Bundesgesundheitsamt, Berlin), pp. 112-116.
- Delincee, H. (1993) Control of Irradiated Food : Recent Developments in Analytical Detection Methods. Radiat. Phys. Chem., 42:351-357.
- Dincer, B., Spearow, J.L., Cassens, R.G. and Greaser, M.L. (1987) The effect of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. Meat Sci., 20:253-265.
- Dobraszazyk, B.T., Atkins, A.G. and Jeronimidis, G. (1987) Fracture toughness of frozen meat. Meat Sci. 21:25-49.
- Ellerbroek, L.I., Lightenberg, G. and Weise, E. (1995) Differentiation Between Fresh and Thawed Meat by an Enzyme Profile Test. Meat Sci.,

- Fairbairn D.W. (1994) Laser Scanning Microscopic Analysis of DNA Damage in Frozen Tissues, *Cancer Letters* 76:127 132.
- Franek, M., Kolar, V., Granatova, M. and Nevorunkova, Z. (1994) Monoclonal ELISA for 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid : Characterization of Antibodies and Assay Optimization. *J. Agric. Food Chem.*, 42:1369 1374.
- Gottesmann, P. and Hamm, K. (1983) New biochemical methods of differentiating between fresh meat and thawed, frozen meat. *Fleischwirtsch.*, 63(2):219 221.
- Green, M.H.L., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anstey, A.V. and Arlett, C.F. (1992) UV-C Sensitivity of Unstimulated and Stimulated Human Lymphocytes from Normal and Xeroderma Pigmentosum Donors in the Comet Assay : A Potential Diagnostic Technique, *Mutation Res.*, 273:137 144.
- Grujic, R., Petrovic, L., Pikula, B. and Amidzic, L. (1993) Definition of Optimum Freezing Rate 1. Investigation of Structure and Ultrastructure of Beef *M. longissimus dorsi* Frozen at Different Freezing Rates. *Meat Sci.*, 33:301 318.
- Hellman, B., Vaghef, H and Boström B. (1995) The Concepts of Tail Moment and Tail Inertia in the Single Cell Gel Electrophoresis Assay, *Mutation Res.*, 336:123-131.
- Holt, J.C. and Lowey, S. (1975) An immunological approach to the role of the low molecular weight subunits in myosin. I. Physical Chemical and immunological characterization of the light chains. *Biochem.*, 14(21):4600 4609.
- Johanson, K. (1991) The Microgelelectrophoresis Method, a Method for Determination of Irradiated Food, Report of the European Communities, for Information, Chemical Analysis, EUR 133331 EN, pp. 52-58.
- Lannari, M.C. and Zaritzky, N.E. (1991) Effect of packaging and frozen storage temperature on beef pigments. *Int. J. of Food Sci. & Tech.*

26:629-640.

- Martin, R., Wardule, R.J., Jone, S.J., Hernandez, P.E. and Patterson, R.L.S. (1991) Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixture of raw beef and pork, *Meat Sci.* 27:23-31.
- Olive, P.L., Banath, J.P. and Durand, R. (1990) Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet assay". *Radiat. Res.* 122, 86-94.
- Östling, O. and Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic Study of Radiation induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.
- Östling, O. and Johanson, K.J. (1987) Bleomycin, in Contrast to Gamma Irradiation, Induces Extreme Variation of DNA Strand Breakage from Cell to Cell, *Int. J. Radiat. Biol.*, 52(5):683-691.
- Park, J.H., Lee, J.W., Shin, H.K. and Kim, J.B. (1994) Monitoring the degree of the frozen Denaturation of Skeletal muscle myosin by ELISA method. The 40th International Congress of Meat Science & Technology. Hague, Netherlands.
- Quass, D.W. and Briskey, E.J. (1968) A study of certain properties of myosin from skeletal muscle, *J. Food Sci.*, 33:180-187.
- Sakata, R., Oshida, T., Morita, H. and Nagata, Y. (1995) Physico-Chemical and Processing Quality of Porcine *M. longissimus dorsi* Frozen at Different Temperatures. *Meat Sci.*, 39:277-288.
- Sargeant, J.G., Bowre, H.M. and Billanton, M.J. (1993) Determination of papain in raw meat by immunoassay, *Meat Sci.*, 34:39-41.
- SAS Institute. (1988) *SAS/STAT™ User's Guide*, 6.03 Ed., SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shin, H.K., Park, K.S., Lee, J.W. and Kim, J.B. (1993) Studies on the development of ELISA for monitoring porcine myosin. *Korean J. of Food Sci. & Tech.*, 25(6):265-268.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988) A Simple

- Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells, *Exp. Cell Res.*, 175:184-191.
- Singh, N.P., Tice, R.R., Stephens, R.E. and Schneider E.L. (1991) A Microgel Electrophoresis Technique for the Direct Quantitation of DNA Damage and Repair in Individual Fibroblasts Cultured on Microscope Slides, *Mutation Res.*, 252:289-296.
- Tice, R.R., Andrews, P.W. and Singh, N.P. (1990) The Single Cell Gel Assay : A Sensitive Technique for Evaluating Intercellular Differences in DNA Damage and Repair, in : B. M. Sutherland and A. D. Woodhead (Eds.), *DNA Damage and Repair in Human Tissues*, Plenum, New York, pp. 291-301.
- Wagner, J.R. and Anon, M.C. (1985) Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. *J. of Food Tech.* 20:735-744.
- Wagner, J.R. and Anon, M.C. (1986) Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. I. Myofibrillar ATPase activity and differential scanning calorimetric studies. *J. of Food Tech.* 21:9-18.
- Wagner, J.R. and Anon, M.C. (1986) Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. II. Influence on solubility, viscosity and electrophoretic behaviour of Myofibrillar proteins. *J. of Food Tech.* 21:547-558.
- Weed, A.G. and Pope, B., (1977) Studies on the chymotryptic digestion of myosin. Effects of divalent cations on proteolytic susceptibility. *J. Mol. Biol.*, 111:129-157
- Willenbera, B.J. (1996) *Quality for Keeps : Food Preservation - Freezing Basics*, Human Environmental Sciences Publication GH1501.
- 이주은 (1995) 육단백질 myosin의 동결 변성도 측정. 건국대학교 석사학위논문.