

畜産物을 利用한 低 알레르기

特異食(患者食, 離乳食)의 開發

Development of hypoallergic special food(patient and weaning food) by use of animal products

연구기관 : 전북대학교 농과대학

동물자원과학과

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ 畜産物을 利用한 低 알레르기 特異食(患者食, 離乳食)의 開發” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 일

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 이 부 응

연 구 원 : 장 윤 기

연 구 원 : 허 문 영

연 구 원 : 김 태 화

협동연구기관명 : 우석대학교

협동연구책임자 : 문 용 일

# 요 약 문

## I. 제목

畜産物을 利用한 低 알레르기 特異食(患者食, 離乳食)의 開發

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라의 축산기술과 소비 수준은 해방이후 괄목할 만한 발전을 거듭하여 상당한 수준에 와 있다고 할 수 있다. 그러나 우리나라 국민 일인당 축산물 소비량은 우유와 식육이 서양에 비하면 1/10정도 밖에 되지 않는다.

축산물의 소비의 증대 방안은 다각도로 생각할 수 있으나 加工法의 도출이 중요하다고 할 수 있다. 우선 식육 특히 돈육에서 잘못 알려져 있는 認識 이 타파되어야 한다. 전통적으로 豚肉이나 鷄肉은 牛肉보다 식품가치가 낮다고 인식되어 있다. 또 관습적으로 한약의 보약등을 복용할 때에 돈육, 계육 등을 禁忌하여 더욱더 돈육, 계육의 식품가치를 낮게 평가하는 경향이 소비증대 장애요인이다(**돈육은 잘 먹어야 본전이다**).

한의학에서 돈육이나 계육은 熱이 많다고 하여 열이 allergy에 상응한다고 생각하였으나 실제로 역학조사나 실험에 의하여 돈육, 계육은 우육보다 allergy가 많다는 증거들이 규명되어야 한다. 육의 소비를 저해하는 커다란 원인라고 할 수 있다. 이러한 관념은 동양에서도 우리나라에만 있는 것 같다. 근대적인 축산구조를 가지기 위하여 이 잘못된 관념을 불식시키는 이론적 근거를 확립하여 계몽하면 소비증대의 길이 있으리라 본다. 우리 조상 한의사들이 돈육, 계육을 금기한 것은 사실상 상당히 논리적이라고 할 수 있다. 왜냐하면 돈육, 계육은 먹는 빈도가 우육보다 높고 냉장고가 없었던 시절에 산패로 인하여 생성된 amines류들로 인하여 histamine 섭취 증상(알레르기 증상과 유사)이 있으면 이 때 보약은 약효가 없게 되니 당연하다고 생각된다.

산패 실험에서 돈육, 계육이 지방산 친화가 VBN(volatile basic nitrogen)증가되어 histamine양과 관계가 있다(Yamanaka 등, 1987).

임상적으로 고등어 allergy를 호소하는 환자가 많으나 항원-항체 반응이 나타나지 않는 경우가 많다. 이것을 가공된 고등어가 amine을 발생시켰기 때문이다. 선행연구(수산식품에서 알레르기성을 감소시키는 가공학적 방법, 1996, 학술진흥재단)에서도 이것은 allergy가 크지 않은 것으로 나타나 이것은 不耐症(intolerance)으로 보인다.

또다른 중요성은 환자식이나 이유식 같은 특이식이 국내에서 조직적으로 저알레르기 처리된 것이 없다. 특히 환자식중에 유동식 같은 것은 병원 영양사에 의해 주로 대부분 병원에서 조제되므로 위생적으로나 영양에도 문제가 있고 유제품에서 유래된 경우 유당불내증이나 allergy가 문제가 야기된다. 우유나 육으로 모든 특이식을 공급하여 영양상 문제가 적고 allergy로부터 안전한 제품의 개발이 필요하다.

또다른 한편 가정에서의 조리법도 저 allergy 처리가 가능하다. 전반적으로 안전한 고품질 영양의 축산물의 소비를 증대하는 연구이다.

### III. 연구개발내용 및 범위

각각의 식육에 대해 각 부위별과 우유 단백질을 면역시켜 抗 혈청을 얻은 다음 이것을 이용하여 식육과 우유의 알러젠성과 알레르기를 감소시키는 공정을 도출시키고 알레르기를 억제하는 인자를 조제하고 이런 결과로 저 알레르기 식을 제조한 후 그것의 잔여 알레르기성을 평가한다. 또한 진단용 알러젠을 조정제하며 환자 혈청으로 低 알레르기 처리된 제품의 단백질과 환자 혈청과 반응%시켜보아 저 알레르기의 최종적 평가되었다.

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

축산물 특히 식육의 소비 증대에 장애요인이 되고 있는 돈육과 계육의 일반 국민들이 우육에 대해 과소평가하고 있는 의식만 타파된다면 低價 돈육, 계육의 소비가 더 촉진되어 농민의 소득을 증가시키고 국민 영양을 향상 시켜 축산업을 안정화시키는 계기가 될 것으로 보인다.

그러므로 돈육이나 계육에 대해 危害要因이 나 식품가치가 절대로 뒤지지 않는다는 대 국민 홍보자료를 농림부가 이 홍보자료를 활용하기를 바란다. 아울러 한의사들에게도 돈육이나 계육이 알레르기가 우유과 비교해 차이가 없는 점등을 주지시켜 보약 등을 복용할 때 돈육, 계육을 금기시키지 않는 이론적 근거등을 홍보할 필요가 있다고 본다.

한편 알레르기의 危害가 전혀 없는 것은 아니기 때문에 알레르기 가능성이 높은 환자들이나 어린이들을 위한 가정 조리법을 홍보하여 가정에서도 저 알레르기 처리를 하여 영양가와 기호성이 높은 돈육, 우육을 섭취하여 영양 균형에 이바지 하여야 할 것으로 보인다.

이러한 홍보가 축산물 소비증대를 유도하여 축산업 안정화에 기여 할 것으로 사료된다.

## 요 약

- 각 식육의 부위별에 따른 allergy는 축종간 차이는 있지만 그 알러젠성이 인정되었다. 소의 경우에는 등골과 천엽위, 돼지의 경우 삼겹살, 안심, 위에서는 그 반응이 나타나지 않았으며 닭의 경우에는 다리, 허파, 심장, 가슴, 간에서 오리의 경우에는 다리, 허파, 심장, 가슴에서 그 반응이 나타났다.

- 우유에 경우에 있어서는 allergy는 이미 잘 알려져 있는 사실이다. 우유와 유단백질 즉 casein이나 유청단백질 모두에게서 알러젠성을 나타내고 있다. 각 유단백에 대한 반응의 결과는 western blotting의 결과는 casein과 유청단백질 사이의 공통반응성은 나타나지 않은 것으로 나타났다.

- PCA와 shock score의 상관관계는 PCA 억제율이 높으면 shock score의 등급이 낮으며 이것으로써 PCA에서 나타난 局所적 변화가 전신적변화 shock score와 비례하는 것으로 나타났다.

- 식육의 경우에 있어 PCA에 대한 western blotting에 있어서는 같은 결과를 보이고 있었으며 가슴등 살부위와 내장등의 부위와도 공통반응이 일어나는 않음을 볼 수 있다. 이것은 살부위에 있는 단백질의 구조와 내장등 부위에 있는 단백질 구조가 다르기 때문이라 볼 수 있다.

공통반응성 반응은 소고기에 경우 부위간 차이는 적고 내장과의 반응도 없었다. 돼지고기, 닭고기 그리고 오리고기의 경우에 있어서는 같은 결과를 보였다. 이것에 대한 western blotting의 결과에서도 같은 결과였다.

- 축종간 공통 항원성의 western blotting적 변화는 소고기의 경우 소 등심에 대해 돼지 삼겹, 오리가슴, 닭가슴등과 그 반응성이 인정됨을 알 수 있다. 돼지의 경우나 닭 가슴, 오리가슴의 경우에서도 마찬가지로 결과를 보이고 있음을 알 수 있다. 이는 살부위는 살부위끼리 그 공통항원성이 인정되었다. 더 민감한 면역기술은 브라운 노르웨이를 이용한 기술로 항원을 경구적으로 투여하여 그 반응을 보는 것이다.

- 우유의 경우 각 유단백에 대한 상호교차반응은 casein과 유청에서 보면  $\alpha$ 와

$\beta$ -casein에서 서로 교차반응이 일어났으며  $\kappa$ -casein에서는 어떠한 상호교차반응도 일어나지 않았다. 유청단백질의 경우  $\alpha$ -lactoglobulin에서 역시 상호교차반응을 일으키지 않았다. 그러나  $\beta$ -lactoglobulin에서는  $\beta$ -casein과  $\alpha$ -lactoglobulin에서 교차가 일어났다.

식육과 우유의 공통반응성의 반응은 존재하지 않는다는 것을 볼 수 있다

- 저알레르기 처리 공정은 Autoclaving, 가열처리, micro wave, dry heating, 초음파, 효소, 인산염, 천연효소, 가용화, 복합처리등의 처리 공정으로 처리를 하였다. 저 allergy 처리에서 allergy가 완전히 억제되는 것은 가열처리를 한 것으로 쇠양 B(추출액+가열 3분), autoclave 처리, micro파 처리, dry heating처리, 복합처리를 했을 때이다. 또한 천연효소(키위)를 침지한 후 tolergen과 같이 3분간 가열했을 때 allergy가 억제되는 것으로 나타났다. 즉 가열처리로 인한 단백질 구조 변성으로 이러한 결과를 보인 것으로 보인다. 인산염의 경우도 어느정도 억제가 되는 것으로 보이고 있다. 나머지 처리들은 거의 효과를 보이고 있지 않다. 천연효소와 tolergen(쇠양)을 그냥 처리했을때에는 allergy 억제효과는 없는 것으로 나타났다.

우유의 저 allergy 처리는 효소, autoclave, micro 파, NaOH 처리, 복합처리에서 감소되는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 western blotting으로도 확인되었으며 그 억제율 %은 식육에서는 상당한 가열처리를 통하여 알레르기를 감소시킬 수 있는 것을 볼 수 있으며 또한 인산염, 가용화(NaOH처리)도 저 알레르기 효과가 있음을 알 수 있다. 키위, 쇠양 단독 처리 시 저 알레르기 효과가 없지만 약간의 가열을 통하여 알레르기가 감소됨을 알 수 있다. 우유는 효소나 autoclave 처리만이 저 allergy 효과가 각각 28%, 45%로 적게 나타났다. 모든 복합처리의 경우에는 그 억제율이 41-96%로 높은 효과가 있음을 알 수 있다.

천연효소처리와 인산염 처리된 식육의 전자현미경적 관찰은 control과 비교시 조직의 변화가 없고 둘다 근육 단백질 구조를 분산시키는 것으로 나타났다.

또한 고기를 단계별 복합처리로 저 allergy 처리는 단계별로 점차적으로 allergy가 감소되었다. 즉 단계별로 억제가 안되는 것부터 억제되는 처리를 복합적으로 처리한 것으로 그 단계는 천연효소 처리에 인산염 처리, 여기에 초음파 처리, 마지막 단계로 3분 끓이면 억제율이 68%까지 억제되었다. 이는 단일처리시 전

히 억제할 못하는 처리를 단계별로 한 단계씩 더해가면 allergy 억제효과가 나타난다고 할 수 있겠다.

초음파 처리도 역시 저 allergy 처리 공정에 이용될 수 있는데 이것은 그 처리로 인해 새로운 알러젠이 생성될 수도 있다. 또한 복합처리로 allergy를 감소시키면 연속적이고 동시에 하기 때문에 원가를 절감할 수 있다.

Food rotation program으로도 allergy를 감소시키는 하나의 방법이라 할 수 있다. 이것은 allergy가 많은 음식을 피해서 매일 rotation을 하여 allergy 유발 음식을 피하는 것이다. 즉 일반 알러젠을 제거하는 diet(우유, 계란, 고기)는 기본적으로 이용한다. 그런 다음 각 category(야채, 과일, 음료나 주스)로부터 한가지 음식을 포함하게끔 하는 것이다.

- 잔여 allergy는 저 allergy 처리 즉 복합처리를 거친 향원을 다시 면역을 시켜 얻은 혈청을 가지고 그 잔여 알레르기 평가를 실시하였다. 결과는 잔여 allergy가 존재하였다. 이것은 새로운 allergy가 존재한다고 할 수 있다. 누구도 현재까지 이것에 관한 정의를 내린 사람은 없었다.

- 각 용매에 추출된 tolergen들을 gel chromatography를 통해 tolergen들이 column을 통과하면서 silica gel이 그 색소를 흡착하여 tolergen만 통과하는 것이다. 이렇게 하여 tolergen을 정제하였다. 이렇게 조정제된 쇠양을 경구 투여하여 PCA를 실시하면 allergy가 감소되는 것으로 나타났다. 우유 allergen은 그런 tolergen이 알러젠성을 억제시키는 인자인 것을 나타내지 못했다. 이 tolergen(쇠양)은 저알레르기의 의미로 생각할 수 있는 항 히스타민을 함유하고 있지 않았다.

- 시판 조제분유에 있어 국내외 hypoallergic 조제분유와 일반 조제분유에 있어서 allergy는 외국산이나 국산 hypoallergic 조제분유에서는 반응이 일어나지 않았다. 이것은 hypoallergy 조제분유로 단백질을 저단백으로 가수분해 시켜 allergy 반응이 나타나지 않은 것으로 보인다. 이 hypoallergic 조제분유의 비단백태 질소함량은 52-85%까지 인데 비해 국산 조제분유에서는 NPN 함량이 94%로 너무 많은 단백분해가 일어난 것으로 보인다. 너무 많은 단백분해로 쓴맛의 출현과 신장의 부담을 줄 수 있다고 본다. 따라서 과다하게 단백분해가 되지 않고 알레르기를 억제할 수 있는 공정도출이 필요하다고 본다. 일반 조제분



유에 있어서는 allergy가 존재하였다.

- 저 allergy 특이식의 제조 공정은 다음과 같다.

유동식은 저 allergy 처리된 고기를 이용하여 가열과 교반을 통해 제조한다. 이때의 저 allergy 처리는 천연효소 즉 키위를 오랫동안 처리하면 거의 액상으로 가깝게 된다. 즉 유동식이다.

죽상식은 고기를 Autoclave 30분하고 오랫동안 삶는다. 그래서 고기 맛이 나게 하여 죽상식을 제조한다. 소화전처리를 하여 소화를 용이하게 한다. 예를 들면 쇠고기 에대가 우유와 다른 양념을 넣어 만드는 쇠고기 죽상식을 제조한다. 쇠고기 대신에 다른 고기를 대신해서 제조해도 된다. 그 공정은 다음과 같다.

고 단백질(고기)의 경우 지방이 없는 고기만을 가지고 제조하는데 여기에 탈지분유를 첨가하여 제조한다. 이 때도 역시 저 알레르기 처리된 고기를 이용한다. 저 알레르기 처리는 가열과 autoclave 등을 통해 처리하여 고 단백식을 제조한다.

저알레르기 우유 제조 공정은 도출된 저알레르기 처리 공정을 거쳐 저알레르기 우유를 제조하는 것이다. 저 알레르기 우유를 개발한다 해도 유당불내증이 아이들에게는 문제가 될 수 있다. 이를 위해 유당을 발효과정을 통해 분해시킨 후 최종 알레르기 실험을 통해 제품을 제조한다. 음용유로 할 수 있고 각종 특이식 원료로 사용한다. 이 때 저 allergy 처리는 인산염처리 후 NaOH 처리 그 다음에 10분간 autoclave를 하여 처리를 한다. 물론 저 allergy 유무 후 제조한다.

이유식제조 공정은 저알레르기 처리된 우유와 여기에 맛을 좋게 하기 위해 고기를 첨가하여 제조한다. 즉 끓는 물에 고기를 넣고(저 allergy 처리) 고기를 잘게 썬다. 우유도 역시 끓인다. 이 두 원료를 섞어 냄비에 넣고 조린 다음 이유식으로 사용한다. 물론 원료 제조 후 혼합 배합하여 알레르기실험 통해 저 알레르기 확인 후 제품을 제조한다.

발효유에서 항 allergy 인자는 우석대학교 문용일 교수의 협동과제로 pH 4.6 soluble nitrogen 분획물인 각 균주를 이용 항 allergy 인자를 검색하였다. 총 11

개의 분획물 중 Bacillus subtilis 10% 환원 탈지유 배양 후 pH 4.6으로 조정 - centrifugeation - filtering(whatman No. 542)의 supernatant, Candida + Lactobacillus bulgaricus, Str.thermophilus + Lb. bulgaricus, 45. Lb. rhamnosus에서 항 allergy 성이 있는 것으로 나타났다.

생균제 발효에 의한 우유 발효는 NPN % 분획의 활성으로 저 allergy에 효과를 가져올 수 있다.

- 저 allergy 처리된 항원을 환자혈청과의 반응시킨 의학적 평가는 western blotting으로 확인되었다. control과 비교시 초음파 처리는 그다지 allergy가 감소가 되지 않음을 볼 수 있는데 복합처리의 경우에는 감소되는 현상을 보이고 있다. 또한 모든 가열처리(autoclave, 삶음, micro파, dry heating, 복합처리)된 시료에 대해 환자혈청의 반응성을 본 것으로 모두 autoclave와 복합처리를 했을 때 억제가 최대로 되는 것을 볼 수 있다. 고로 이 처리에서는 allergy를 환자혈청에서도 억제함을 알 수 있다. 이는 가열로 인해 단백질의 구조가 변하여 생기는 것으로 사료된다.

- 환자혈청에 대한 공통 반응성은 살부위는 살부위끼리 반응을 일으키는 것을 볼 수 있다. 이것은 소고기, 돼지고기, 닭고기에서 다 마찬가지이다. 우유와 고기와는 공통 반응성이 인정되지 않았다. 즉 이것은 유단백하고 고기단백의 구조 차이가 인한 것으로 사료된다.

- 진단용 알러젠은 KCl, NaCl, NaOH, MgSO<sub>4</sub>에서 추출한 것들의 전기영동상의 변화는 각 고기에서 변화는 없었으며 시판되고 있는 고기에 대한 진단용 알러젠의 전기영동과도 별 차이가 없었다. 이 알러젠의 저장 및 생물학적 안정성을 rat skin에 반응시켜 SEM으로 관찰한 결과 phenol 함유한 allergen이나 glycerin 함유한 allergen 모두 control과 비교시 별다른 차이가 없음을 볼 수 있다. 이는 제조한 두 가지 allergen이 모두가 생체적으로 안정함을 증명한다. 물리적 안정성에 관해 알러젠의 제조에서 glycerin은 solubility를 안정화시키는데 응용할 수 있다.

- 축종간 고기의 산패실험(volatile basic nitroge, VBN)의 변화에서 생고기와

삶은 고기의 차이는 처음에는 두가지 모두 별 차이가 없다가 시간이 지날수록 그 차이가 나타났다. 즉 생고기에서 48시간 후에 돈육, 계육이 소고기보다 더 VBN이 증가하였다. 삶은 고기에서도 48시간이 되었을 때 돈육과 소고기의 VBN 수치가 현저히 차이를 보였다. 이러한 결과는 산패하는 동안 histamine이 많아진 결과이다. 즉 allergy가 아니고 histamine의 결과라고 할 수 있다.

이것이 예전 한의학 의사들이 돈육과 계육이 쉽게 냉장고가 없던 여름에 소고기보다 histamine을 형성하고 소고기를 먹는 빈도가 돈육이나 계육보다 낮기 때문에 이 돈육과 계육을 금기하는 이유이다. 우리는 위의 설명이 돈육과 계육의 소비를 방해한다고 생각할 수 있다.

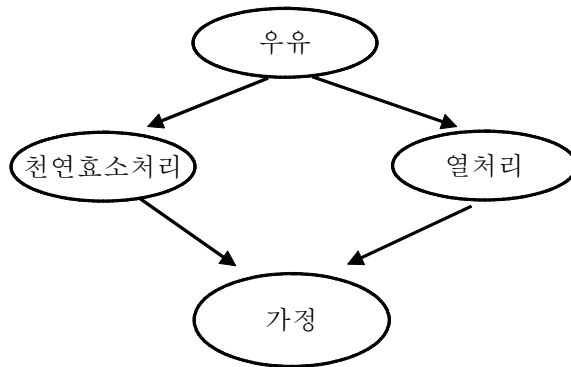
♣ 저 알레르기 처리 공정의 활용

1. 가정용 처리

일반 가정에서 쉽게 할 수 있는 처리 즉, 천연효소인 키위처리나 시판 연육소 등으로 간단하게 저 allergy 처리를 할 수 있을 것이다.

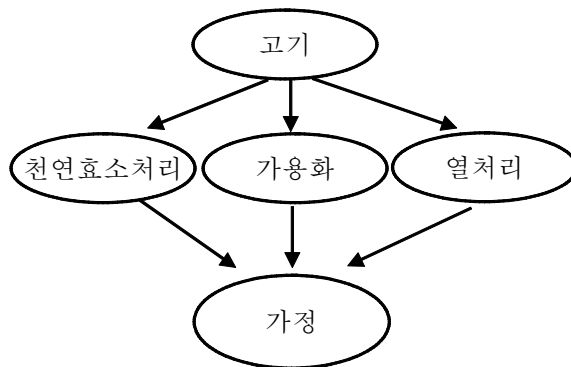
1) 우유

- 천연효소인 키위처리
- 열처리



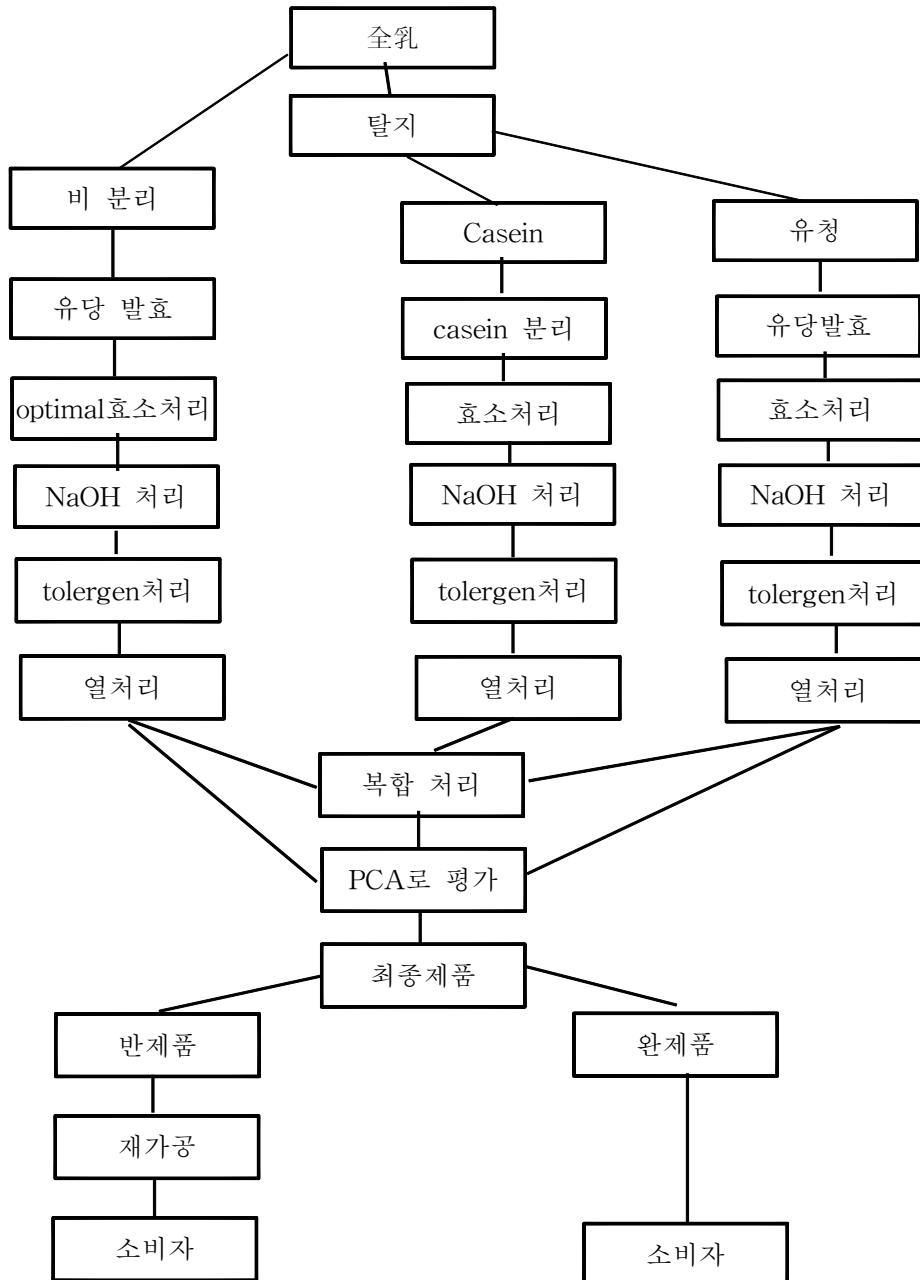
2) 식육

- 천연효소처리.
- 가용화
- 열처리(5분)

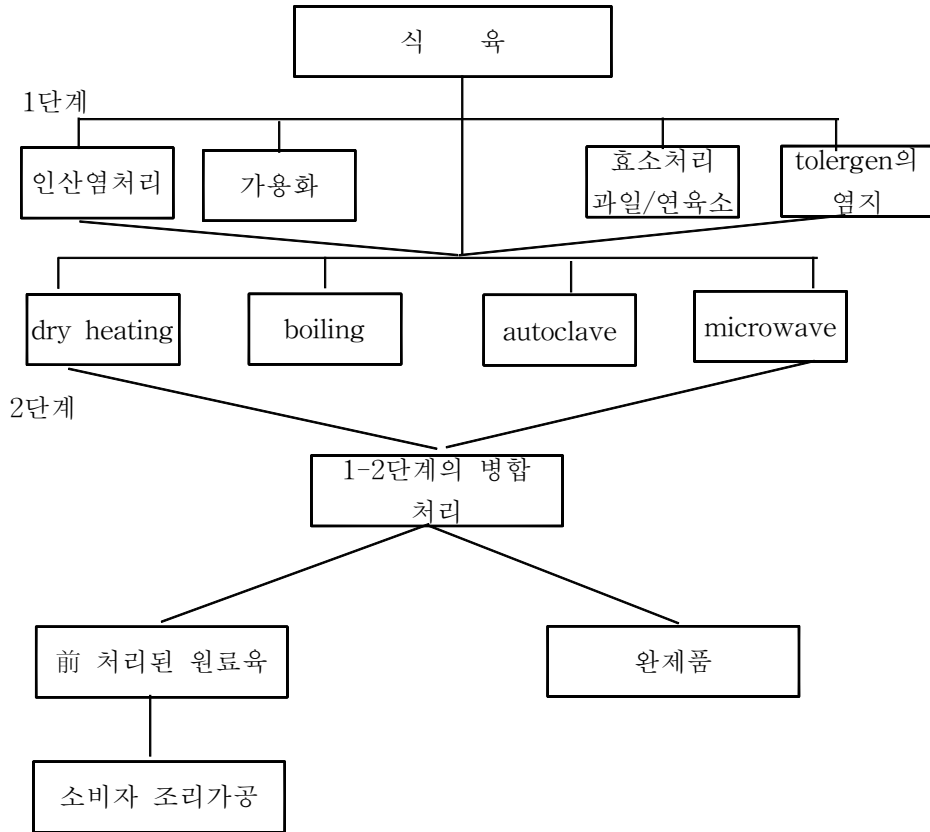


2. 공장(저 allergy 처리공정)

1) 우유



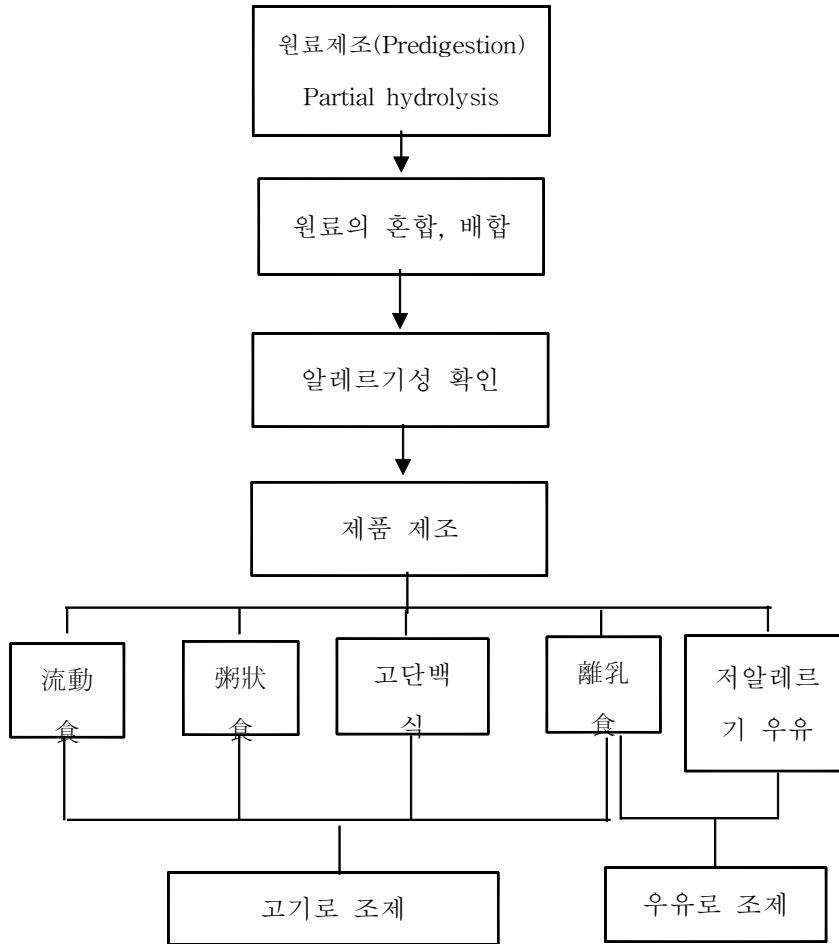
2) 식육



- 단계별 복합처리 ; 처리단계별로 처리를 하여 알러젠성 감소시킴.

- ① 천연효소 키위 + 인산염(0%)
- ② 천연효소 키위 + 인산염 + 초음파(%)
- ③ 천연효소 키위 + 인산염 + 초음파 => 42도 4시간 반응(10.8%)
- ④ 천연효소 키위 + 인산염 + 초음파 => 42도 4시간 반응 + 3분 가열(68%)

♣ 특이식 제조 공정



## Development of hypoallergic special food(patient and weaning food) by use of animal products

Allergenicity according to part between live stock species indicates differently but there are generally allergenicity. There are no cross reaction between backbone and omasum in beef, and belly, tender loin, stomach in pork with compare to chicken(lung, heart, brest, leg and liver) and duck(leg, lung, heart and breast).

The allergenicity milk was well know already so all type of milk protein such as casein and whey proteins indicates own allergenicity but there are no cross reaction between them which confirmed through by western blotting.

In the relationship between PCA and shock score we confirmed that the local inhibition of vascular permeation(PCA) was correlate with the systemic in the case shock score by mice.

In all of the meat the results of PCA indicates the same tendence with compare to western blotting and they did not represent the cross reactivity between lean[red] meat and internal organs which could be conclude from the difference of protein structure between part and origin tissue.

It is concluded also that there are no cross reaction between lean meat and internal organs in pork and duck by western blotting.

Between livestock species loin of beef was cross reacted with belly of pork and duck breast meat and pork belly was cross reacts with lean meat, etc.

It should be recognized with use of more sharpened immunization technique suck as oral or use of brown norway.

In the case cross reactivity between milk proteins,  $\alpha$ -casein can be react



with  $\beta$ -casein but not with  $\beta$ -casein in other hand  $\beta$ -lactoglobulin react with  $\beta$ -casein and also  $\alpha$ -lactalbumin. It is normal that there are no cross reactivity between milk and meat.

We have applied the hypoallergenic treatment for protein such as autoclaving, boiling, microwave, dry heating, ultrasound, enzyme, polyphosphates, natural enzyme(kiwi), solubilization, tolergen and combined with those techniques, among these treatments heating, *Cynomorii Caulis*(extract plus heating), autoclaving, micro wave, dry heating and combine treatment were affect to inhibit the allergenicity in all meat. And natural enzyme(kiwi) treatment with tolergen was also effective to lessen the allergenicity.

From these results it is seen to be that heat treatment could be denatured proteins structure. It is important to be notified that polyphosphate could diminish slightly the allergenicity of protein. The rest of treatment such as ultrasound, kiwi, *Cynomorii Caulis* extract had no effect of inhibition to protein for allergy.

The treatment with tolergen(*Cynomorii Caulis*) and natural enzyme without heating did not bring to decrease of allergy. In hypoallergenic treatment for milk, enzyme, autoclaving, micro wave, NaOH and combination of treatment could be diminish the allergenicity.

These results were confirmed by western blotting considerable inhibition rates of allergenicity for meat could be decrease by applying the high temperature and polyphosphate, solubilization by NaOH treatment could also effectively decrease the allergenicity.

The treatment of natural enzyme(kiwi) and *Cynomorii Caulis* without any combination was not effective but it could be effective if there are additional heat treatment. The enzyme and autoclave treatment for milk indicated the % of inhibition as 28 and 45% respectively and successive combination of treatment could inhibit highly effectively of allergy to 40-96%.

The observation of SEM in meat on enzyme(kiwi) and polyphosphate treatment did not change the structure compared to control and both were

dispersed the muscle protein structure.

One can noticed that there are gradually diminish of allergenicity according to treatment step. we have tart to applicate from the lowerly the effect technique in combination of treatment such as natural enzyme, polyphosphate, ultrasound, finally boiling for 3 min subsequent in order which could arrive until 68% of inhibition rate.

Ultrasound treatment also could use hypoallergic treatment but this treatment may be provoke neoallergen by ultrasound. Combination treatment in hypoallergic treatment can be reduce the cost because the processing for treatment achieve subsequently and simultaneously.

Food rotation program also is one of method for decreasing allergy. This is to avoid food which allergy is much. The food is rotated with other foods. A diet eliminating common allergens(milk, egg) is used as a basic. Then one food from each category of fruits, vegetable and beverage or juice is included. This way we could be avoid allergy.

The results means that weakly active technique could also accumulate the reaction additionally so they could arrive the inhibition of allergy. The study of neoallergy was also attempted by use of sample with completely diminish allergenicity(combine treatment) which indicate the another allergenicity. Until now no body propose the problem of this definition.

For the use of tolergen extracted from *Cynomorii Caulis* in water, we could eliminate the brownish color of extract through pass of silicagel column chromatography for the purpose of purity. After purified tolergen were fed orally to guinea pig we followed the PCA on back of guinea pig but milk allergenicity was not reveal so tolergen can inhibite the allergenicity it did not contain anti-histamine agents which could be also think a hypoallergic means.

We have been collect the infant formulas as hypoallergic and ordinary in

European, Korean for the analysis of allergenicity. There are no residual allergenicity in hypoallergic of infant formulas whatever product from Europe and Korea. So it could be concluded that milk protein was sufficiently hydrolysed to low molecular weight of protein.

The proportion of NPN % in Korean hypoallergic formulas represent the form to 94% with compared to 52-85 of those in European. It seems to be that over hydrolysis can provoke the bitter taste and renal load.

It is necessary to establish the favorable technical procedure for desirable proteolysis without allergenicity for above purpose. PCA and electrophoresis were followed on ordinary infant formulas.

Hypoallergic treatment with family kitchen scale was also established, meat or milk were treated with natural enzyme (kiwi with polyphosphate or ultrasound, heat-3min) so hypoallergic treatment can be applied at home by house wife which can accelerate the consumption of animal products.

We have also established that the fabrication of special diet such as fluid meal, paste meal, high protein diet, weaning diet, hypoallergic milk is following ;

Fermentation of milk by probiotic lactation can also bring the hypoallergic effect with the action of NPN fraction.

Our hypoallergic treatment were confirmed the diminishing allergic effect by use of human serum (allergic patient subject) for the medical evaluation of establishment of treatment by use of western blotting. Ultrasound treatment did not change but combined treatment clearly diminish the reactivity and all of heat treatment such as autoclaving, boiling in water, dry heating include combined so our hypoallergic treatment is exact.

Our experimental or cross reaction between different lean meat were also confirmed by human serum as well as rabbit serum in meats (beef, pork, chicken).

We have compared electrophoretically the our preparation of allergen(KCl, NaCl, NaOH, MgSO<sub>4</sub> extraction) with commercial allergen and biological saftly and physical stability of our allergen were also verified through by skin structure by SEM and by change of solubility at 36°C for 4 weeks. For the preparation of allergen at level of physical stability, glycerin should be applicate which could stabilize the solubility.

We have followed the experiment of conservation stability at 36°C to evaluate the release of ammonia by determination of VBN which can be estimate the possibility for formation of histamine during conservation of meat. It was well known that histamine in food can provoke pseudo allergic system in human food life.

This is why our ancestor of oriental medicine doctor prohibit to eat the pork or chicken during taking medicine because these meat can easily formed histamine during hot season without refrigerator than beef and frequence of eating the beef was also low than pork and chicken. We think that the above explication was hinder the consumption of pork and chicken.

# Contents

Chapter 1. Outline of project .....	24
Chapter 2. The present situation of technology development in home and abroad .....	26
Chapter 3. Contents and results .....	29
Materials and methods .....	29
1. Basic technique of immunology .....	29
2. Evaluation of allergenicity .....	30
3. Effect of cross reaction .....	30
4. Diminution processing against allergy .....	30
5. Evaluation of residual allergenicity .....	33
6. Preparation of tolergen for inhibition of allergy .....	33
7. Analysis of commercial infant formulas .....	33
8. Fabrication of special food .....	35
9. Medical evaluation .....	36
10. Extraction method of allergen and evaluation of stability .....	37
11. Change of VBN(volatile basic nitrogen) .....	38
12. Screening of ant-allergic factor in fermented milk	38
Results and discussions .....	42
1. Basic technique of immunology .....	42
2. Evaluation of allergenicity .....	47

3. Effect of cross reaction .....	53
4. Diminution processing against allergy .....	64
5. Evaluation of residual allergenicity .....	88
6. Preparation of tolergen for inhibition of allergy .....	89
7. Analysis of commercials infant formulas .....	92
8. Fabrication of special food .....	102
9. Medical evaluation .....	104
10. Extraction method of allergen and evaluation of stability .....	107
11. Change of VBN(volatile basic nitrogen) .....	113
12. Screening of ant-allergic factor in fermented milk	115
제 4 장 Achivement of aim and contribution in related fields .....	121
제 5 장 Utilization of research results .....	122
제 6 장 Degree of foreign science and technology .....	123
제 7 장 References .....	123

# 目 次

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	24
제 2 장 국내외 기술개발현황 .....	26
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	29
연구개발 수행 내용 .....	29
제 1 절 면역학의 기본조작 .....	29
제 2 절 시료들의 알러젠성 평가 .....	30
제 3 절 식육과 우유와 공통항원성 효과 .....	30
제 4 절 알레르기를 감소시키는 공정 .....	30
제 5 절 잔여 알러젠성 평가 .....	33
제 6 절 알레르기를 억제하는 tolergen의 조제 .....	33
제 7 절 시판조제분유분석 .....	33
제 8 절 특이식 제조 .....	35
제 9 절 의학적 평가 .....	36
제 10 절 알러젠 추출법 및 안전성 평가 .....	37
제 11 절 VBN의 변화 .....	38
제 12 절 발효유에서 항 알레르기 인자 검색 .....	38
연구개발 수행 결과 .....	42
제 1 절 면역학의 기본조작 .....	42
제 2 절 시료들의 알러젠성 평가 .....	47
제 3 절 식육과 우유와 공통항원성 효과 .....	53

제 4 절 알레르기를 감소시키는 공정 .....	64
제 5 절 잔여 알러젠성 평가 .....	88
제 6 절 알레르기를 억제하는 tolergen의 조제 .....	89
제 7 절 시판조제분유 분석 .....	92
제 8 절 특이식 제조 .....	102
제 9 절 의학적 평가 .....	104
제 10 절 알러젠 추출법 및 안전성 평가 .....	107
제 11 절 VBN의 변화 .....	113
제 12 절 발효유에서 항 알레르기 인자 검색 .....	115
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에 기여도 .....	121
제 5 장 연구결과의 활용도 .....	122
제 6 장 연구개발과정에서 해외과학기술정도 ..	123
제 7 장 참고문헌 .....	123



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

축산물 allergy는 중요한 allergy 식품이다. 알레르기 질환은 식품, 꽃가루, 먼지 및 접촉 등 다양한 원인에 의하여 다양증상으로 일어나는 증상으로서 전 인구의 20%가 앓고 있으며 매년 0.2%씩 증가하고 있다. 보통의 경우에 생명에는 지장이 없지만 식품 알레르기의 경우에서 anaphylactic shock는 생명에도 위협이 있다고 본다. 이러한 상태에서 알레르기 치료약은 아직 개발되지 않고 발병하였을 때 대증요법으로 치료하는 경우와 원인도 모르고 대증요법으로 넘어가는 경우가 허다하다가 자가 치료로 끝나는 경우들이 많이 있으므로 실제로 이 질병의 %는 다른 어떤 질병보다도 높다고 할 수 있다. 고로 국민의료비의 증가를 초래할 수 있다.

Monert Vautrin(1995)는 알레르기를 일으키는 물질을 알러젠이라고 하는데 식품공업에서 포장에 알레르기성 식품 첨가를 표기하지 않아 알레르기를 일으키는 알러젠을 총칭하여 masked allergen이라고 하고 이것에 의하여 일어나는 anaphylactic shock를 경계하여야 한다고 보고하였다. 많은 의학적 문헌들에서 hidden food allergy는 육체적 정신적 조건의 넓은 범위에서 원인 빈도가 높다. hidden allergy는 elimination diet의 방법으로 unmasked될 수 있다(Gaby, 1998).

현재 새로운 알러젠들이 출현되고 있다. 그 대표적인 것이 GMO와 관련된 식품들이라 할 수 있다.

우리나라의 축산기술과 소비 수준은 해방이후 괄목할 만한 발전을 거듭하여 상당한 수준에 와 있다고 할 수 있다. 그러나 아직도 우리나라 국민 일인당 축산물 소비량은 우유와 식육이 서양에 비하면 1/10정도 밖에 되지 않는다.

축산물의 소비의 증대 방안은 다각도로 생각할 수 있으나 加工法の 도출이 중요하다고 할 수 있다. 우선 식육 특히 돈육에서 잘못 알려져 있는 認識 이

타파되어야 한다. 즉 전통적으로 돈육이나 계육은 우육보다 식품가치가 낮다고 인식되어 있다. 또 관습적으로 한약의 보약등을 복용할 때에 돈육, 계육 등을 금기하기 때문에 더욱더 돈육, 계육의 식품가치를 낮게 평가하는 경향이 있는데 이것이 소비증대 저해요인이라고 볼 수 있다(돈육은 잘 먹어야 본전이다).

한의학에서 돈육이나 계육은 熱이 많다고 하여 열이 allergy에 상응한다고 생각 하였으나 실제로 역학조사나 실험에 의하여 돈육, 계육은 우육보다 allergy가 많다는 증거들이 규명되어야 한다. 육의 소비를 저해하는 커다란 원인이라고 할 수 있다. 이러한 관념은 동양에서도 우리나라에만 있는 것 같다. 근대적인 축산물 소비구조를 가지기 위하여 이 잘못된 관념을 불식시키는 이론적 근거를 확립하여 계몽하면 된다. 우리 조상 한의사들이 돈육, 계육을 금기한 것은 사실상 상당히 논리적이라고 할 수 있다. 왜냐하면 돈육, 계육은 먹는 빈도가 우육보다 높고 냉장고가 없었던 시절에 산패로 인하여 생성된 amines류들로 인하여 histamine 섭취 증상이 있으면 이때 보약은 약효가 없게 되니 당연하다고 생각 된다.

또 다른 중요성은 환자식이나 이유식 같은 특이식이 국내에서 조직적으로 저알레르기 처리된 것이 없다. 특히 환자식 중에 유동식 같은 것은 병원 영양사에 의해 주로 대부분 병원에서 조제되므로 위생적으로나 영양에도 문제가 있고 유제품에서 유래된 경우 유당불내증이나 allergy가 문제가 야기된다. 우유나 육으로 전 특이식을 공급하여 영양상 문제가 적고 allergy로부터 안전한 제품의 개발이 필요하다.

또 다른 한편 가정에서의 조리법도 저 allergy 처리가 가능하다. 전반적으로 안전한 고품질 영양의 축산물의 소비를 증대하는 연구이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발현황

돈육과 계육에서 면역학적 생리기전과 아올러 알레르기에 연구는 이미 오래 전부터 보고되고 있다.(Maraughlan et al. 1981., Heppell et al, 1984. Jost et al. 1987).식육의 低알레르기 처리 연구는 우유에 비해 상대적으로 적다. 식육들이 알레르기가 있다는 보고는 여러 식품 알레르기 서문에 보고되고 있지만 (李, 1997)Autoclave 가 일반조리보다 감소시킨다는 보고 이외에 거의 없다. 국내외를 막론하고 알레르기 의사들에 의해서 돈육이나 계육이 우유에 비해 알레르기가 강하다는 우유에서도 마찬가지로 특히 소아에서 많이 보고되고 있다. 특히 저 알레르기 처리를 가열, 효소가수분해처리, tolergen 첨가, 항 histamine제 첨가, probiotic 미생물 이용, 약초의 첨가, 유전공학적 방법, 방사선 처리 등이다. 각 항별 참고문헌은 다음과 같다.

가열에 관한 구조 변화 -Catisimpoolas, 1976., Kilshaw et al. 1982., Heppell et al. 1984 단백질 분해 효소로 가수분해 -Lui et al, 1967. Takase et al. 1979., Takase et al. 1979., Haung et al. 1985., Granati et al. 1985., Jost et al,1987., Poulson과 Hau, 1987., Asselin et al , 1988., Businco et al, 1989., Chandra et al, 1989., Asselin et al, 1989., Otani et al, 1990., Otani와 Hosono, 1989., Ju et al. 1997

Tolergen 첨가- 이 전형적으로 잘 알려진 것으로는 Na-cromoglycate가 이용되고 있으나 부작용에 문제가 있다(Yamamura, et. al, 1986., Kimata et. al, 1990.,Paganelli et al, 1996., Imamura et al, 1996., Akimo et al, 1997)

Histamine 억제(대중요법)- Nomiyama, 1995.

Probiotic(미생물)-大谷 元, 1988., Majamaa 와 Isolau가, 1997., Isolaurk et al, 1997., Isono et al. 1997

유전공학적 형질전환에 의한 억제-이부웅, 1999., Nakamura et al, 1996., Takano et al . 1996

방사선 처리 -Owen et al, 1995

국내 : 축산기술연구소 연구보고 (1999)가 Casein 의 단백질 분해 효소처리하여 알레르기성을 측정하였다.

연구책임자의 저서- 연구책임자는 독인 DAAD 학술기관에서 추천하여 VCH 출판사에서 출간한 Symposium 集인 “Food allergies and Intolerance”를 번역(선진문화사, 1999)하였다. 이 번역에 앞서 연구책임자는 이 책 원저의 주요 저자인 뮌헨대학교 의과대학 피부알레르기 연구소에서 방문연구를 실시하였다.

연구책임자의 선행연구-농림부 농림기술관리센터에서 1997년 현장애로 기술사

업으로 “부화부산물물의 식육자원화”에서 계란의 알레르기를 감소시키는 방법으로 부화 발생이 알러젠성을 급격히 감소되는 것을 연구관찰 하였다. 본 현상으로 연구에서 계란이 중요한 축산물임에도 불구하고 첨가하지 않는 것은 이 계란의 부화발생이 알레르기성을 현저히 감소시키기 때문에 더 좋은 감소방법이 없기 때문이다. 문제는 계란이 부화되면 고기가 되기 때문에 계란의 상태에서 저 알레르기를 찾아야 하는데 이것은 실익이 없다. 왜냐하면 고기는 저 알레르기 처리하여 응고하여도 소비자가 재조리 가공하여 먹을 수 있어 개발의 실익이 있지만 일단 굳어 버린 계란은 저 알레르기 처리하여 일단 굳어버리면 사실상 조리가공이 안되므로 소비자의 선호도가 없기 때문이다. 왜냐하면 低알레르기 처리하려면 달걀을 제거하고 또 단백질이 低알레르기 처리로 굳어버리기 때문이다. 이러한 이유에서 저 알레르기 처리가 본 연구에서 제외되었다.(정, 1998)

그러나 계란 단백질 하나만으로 低알레르기가 해결되었다고 이유식, 환자식, 조제 분유의 문제가 해결된 것은 아니다. 特異食은 말뜻 그대로 특수식품 기능을 가지고 있기 때문에 보건 기능성 식품(아직까지 전반적으로 개념이 정립 되지 않은)범위에서 低알레르기 기능을 가진 환자식, 이유식, (조제분유포함)들이 개발되려면 우유는 물론 다양한 육류, 우유, 돈육들의 低알레르기 처리공정이 개발되어야 한다. 이 공정이 성공되면 원료의 성격이 있는 제품들의 이용성은 환자식, 이유식, 조제분유 이외에 다양한 제품에 원료로 사용할 수 있다. 왜냐하면 식품마다 맛 과 향이 있어 다양한 식품으로 가능성을 맞추어야 하고 또, 각종식육 돈육, 우유, 우유단백질은 맛과 amino산 조성에서 대단히 중요하기 때문에 계속 과제로 식육과 우유의 低알레르기 공정이 연구되어 다양한 원료로 특이식, (환자식, 이유식), 조제분유가 개발되어야 한다.

지금까지의 관련기술의 문헌을 종합하면 식육에서는 低 알레르기 처리 연구가 많이 진행되고 있지 않고 우유에서 주로 보고되고 있다.

우유의 알레르기에서 우유가 알레르기가 있다는 것은 잘 알려져 있으나 유청 단백질의  $\beta$ -Lg이 강하다는 것 이외에 각 유단백질이 상대적으로 정량적으로 얼마나 강한지에 대한 정량적 연구가 선행되어 있지 않다. 국외에서 알레르기 연구자들이 이런 기초자료 없이 우유에 대한 알레르기가 있는 환자의 혈청과 全乳를 반응시켜 그 반응성으로 알레르기를 판단하고 있다. 우유의 각 단백질들이 공통히 같은 알레르기를 가지고 있지 않다면 알레르기 진단도 단백질별로 실시해야 하고 저 알레르기 단백질 제조기술도 단백질 별로 실시되어야 할 것이다. 적어도 casein과 유청 단백질은 구별되어야 한다.

이러한 이유에서 본 연구자는 각 우유 단백질의 고유 allergenicity의 크기, 강도, 상호 반응성 등을 animal model에서 정립한 다음 그 결과를 가지고 각

단백질 별로 allergenicity를 감소시키는 공학적 방법을 도출하고 이것에 의해서 低 알레르기 유단백 제조공정을 정립하고자 한다. 같은 방법과 원리로 식육단백 질간 및 부위별 연구가 우유 단백질에서처럼 연구되어야 한다. 총괄책임연구자의 선행연구에 인체가 대신할 수 없는 anaphylaxis의 좋은 PCA model (Yamamura et al, 1991)을 이용한 allergenicity는 상대적 수치들이 용이하게 결정될 것이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### ☞ 재료 및 방법

#### 제 1 절 면역학의 기본조작

##### 1. 항혈청의 제조

###### 1) 가용화

신선한 식육을 단백질로 총 볼륨 100에 1%되는 량만큼 채취하여 막자에 잘게 갈아서 증류수로 희석한 후 원심분리하여 남은 침전이 있으면 다시 잘게 갈고 거기에 0.25N NaOH를 조금 첨가하여 10분간 혼합 교반 후 중화시켜 원심분리 여액과 혼합하여 시료로 사용하였다.

우유는 단백질이 1%되게 PBS용액으로 희석하여 사용하였다.

###### 2) 면역

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

###### 3) 혈청분리

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

###### 4) Immunodiffusion

1% agarose gel(0.1% NaCl 포함)을 제조하여 diffusion 용 petridish에 붓고난 후 굳도록 방치하였다. 항체와 항원이 위치하는 곳에 각각 구멍을 뚫고 거기에 항원 80ul와 항체 50ul씩 넣은 후 상온에서 12시간 방치하였다. 그다음에 4℃에서 24시간 방치한 후 띠형성을 관찰하였다.

###### 5) 항혈청의 생성역가

항혈청 제조에서 매주 마다 얻은 혈청을 0, 10, 50, 100, 150,

200...500으로 희석하여 PCA inhibition test를 행하여 blue spot가 완전히 나타나지 않는 희석배수의 역수로 표시하였다.

## 제 2 절 시료들의 알러젠성 평가

### 1. PCA(Passive cutaneous anaphylaxis)

각 시료 항혈청을 PBS로 각각 10배희석 한 것과 원액, 그리고 control 혈청을 약 250~300g체중의 건강한 Guinea pig등 피부에 주사하고 4시간 후 신선한 항원을 1% Evan's Blue를 혼합한 것을 정맥에 주사한다. 30분후 희생시켜 Guinea pig등에 나타난 blue spot을 관찰하여 희석배수를 이용하여 역가를 구하였다. 피부에 여러 다른 종류의 항혈청을 주사함으로써 각 시료간 cross reactivity도 판정할 수 있다.

알레르젠성을 확인하는 in vivo 방법이라 할 수 있다. 이 PCA 방법은 알레르기의 판정여부와 공통반응(상호교차반응)을 관찰 할 수 있는 방법이다.

### 2. Western blotting

각 항원에 각 혈청의 상호반응을 보기 위해 항원을 SDS-PAGE전기영동을 한 후 gel을 nitrocellulose paper에 801시간 동안 transfer를 한 후 nitrocellulose paper를 0.2% Tween 20으로 overnight 한 후 0.1%의 Tween 20으로 3번 세척하였다. 혈청을 0.05% Tween 20으로 1:100으로 반응시키고 난 후 또다시 세척하였다. 그 후에 Bovine alkaline phosphate(IgG)로 희석하여 1시간 반응시킨 후 기질을 넣어주어 발생시켜 실온에서 건조하였다.

## 제 3 절 식육과 우유의 공통항원성의 평가

항혈청 조제에서 분리된 각 유단백질 항원에 Guinea pig에서 anaphylaxis를 확인하고 shock score로 등급을 평가한다. 최소 희석 배수로 역가를 정한다. 우유 단백질간에 공통항원성 및 식육단백질간에 공통항원성을 평가한다.

## 제 4 절 알레르기를 감소시키는 공정

### 1. 물리적 처리

#### (1) Autoclaving

식육과 원유를 autoclave에서 120도로 30분간 가열 후 냉각 시켰

다.

(2) 가열처리

식육을 끓는 물에서 5분간 삶은 후 냉각 시켰다. 우유는 5분간 가열처리 하였다.

(3) microwave 처리

식육을 비금속 용기에 넣어서 물을 넣어 전자 렌지에서 30분간 저온에서 가열한 후 시료로 사용하였다. 우유는 3분씩 10차례를 걸쳐 저온에서 가열 후 시료로 하였다.

(4) dry heating

식육을 dry oven에서 110도로 2시간 dry heating 시켜서 시료로 사용하였다.

(5) 초음파 처리

식육과 우유를 SONICS & MATERIALS(INC. 53CHURCH HILL RD. NEWTOWN, CT U.S.A.)를 사용하여 FREQ 20KHZ Ampl 80% , 20분간 처리하여 시료로 사용하였다.

2. 화학적 처리

(1) 효소처리

식육은 Papain(sigma. USA)을 사용하여 효소의 농도는 기질의 0.5%로 반응 온도는 42도로 pH는 7.0으로 조정하였고 반응시간은 6시간으로 하였다. 반응 후 3min간 가열하여 시료로 사용하였다. 우유는 Alcalase(sigma. USA)를 사용하였다. 효소의 농도는 기질의 0.05% 첨가하고 반응 온도는 45도로 pH는 7.0으로 조정하였고 반응시간은 4시간으로 하였다.

(2) 인산염 처리 및 가열

식육은 0.5%의 pyrophosphate(sigma. USA)용액을 만들어 2일간 침지 시킨 후 2분간 가열처리 하였다. 우유는 0.5%가 되게 pyrophosphate를 첨가하여 마찬가지로 3분간 가열처리 하였다.

(3) Tolergen(鎖陽)처리

A: 식육은 쇠양 10g에 증류수 30ml 넣어서 boiling water bath 상에서 3시간(85도) 침출 한 여과 액으로 2일간 침지 시킨 후 시료로 사용하였다. 우유는 직접 쇠양 추출 액을 2%되게 첨가하였다. B: 위에서처럼 처리한 시료를 3분간 가열 처리하였다.

(4) 천연효소(키위)처리

A: 키위를 잘 갈아서 즙을 얻은 후 고기와 동량으로 하여 2일



간 침지 시킨 후 42도에서 4시간 반응 시켜서 시료로 사용하였다. B: 위에 서처럼 처리한 시료를 3분간 가열 처리하였다.

(5) NaOH 처리(가용화)

우유에 0.5N NaOH 용액으로 0.2N가 되게 조절하고 냉장에서 하루 동안 정치 후 중화 시켰다. 다음 1분간 micro wave 처리하였다.

3. 복합처리

식육은 0.3% Pyro phosphate 용액과 키위 즙을 혼합하여 초음파로 Ampl 40%에서 20분간 처리 후 2일간 침지 시킨 후 42℃에서 4시간 반응 시킨 후 2min 가열하여 시료로 사용하였다. 우유에 0.3% Pyro phosphate 를 첨가하여 초음파로 Amplification 40%에서 20분간 처리 후 Autoclave에 서 120도로 10분간 가열 후 냉각시키고 거기에 1% 쇠양 추출 액을 첨가하 였다.

처리	조건
복합처리	식육 - pyrophosphate/초음파 Amplification 40%/20분/2분가열 우유 - pyrophosphate/초음파 Amplification 40%/20분/autoclave 120℃/10분가열
키위처리 B	42℃/4시간/3분가열
쇠양처리 B	3시간 물로 추출한 추출액/3분 가열
Autoclaving	120℃/30분
가용화	0.2NaOH로 가용화-중화/1분 micro처리
Micro wave	식육 - 30분 우유 - 3분씩 10번
인산염	식육 - 0.5%pyrophosphate 2일간침지/2분 가열처리 우유 - 0.5%pyrophosphate 2일간침지/3분 가열처리
Boiling	5분
dry heating	110℃/2시간
효소	식육 - papain 42℃/6시간, pH 7, ->3분가열 우유 - papain 45℃/4시간
키위 처리 A	42℃/4시간/
쇠양 처리 A	3시간 물로 추출한 추출액
초음파	Amplification 80%/20분

## 제 5 절 잔여 알러젠성 평가

잔여 알러젠성의 측정은 공정 처리 후 남아있는 알러젠성을 처리전과 비교한다. 원리는 우유나 식육이나 같으나 실험하는 방법은 최소 항원과 비교하기 때문에 어떤 항원(각 식육의 부위별 + 각 우유단백질)별로 평가된다. 개발된 각종 식육, 우유 단백질이 低7알레르기 처리된 후 남아있는 알러젠성을 알러젠성 측정하는 동일한 방법으로 측정하였다. 발효유단백(고분자)의 잔여 allergenicity가 평가되어야 저분자추출물의 부산물 이용성이 고려되어야 한다. 각 평가는 PCA로 평가되었다.

## 제 6 절 알레르기를 억제하는 tolergen(인자)의 조제

### 1. 약초의 추출

선행연구에서 알레르기 억제능이 있는 杜冲, 螻蛄 補骨脂, 夏枯草, 鎖陽, 蒲公英, 枸杞子, 地骨皮, 山茱萸, 附子, 側柏葉, 貫衆, 女貞實, 益智仁, 苦蔘, 漕溝籐, 烏梅, 密夢花, 知母, 白朮 등 한약재를 구입하여 물추출법으로 1kg을 5l의 증류수에 넣어 24시간 3회 추출한 것과 그 잔사를 수욕상에서 2시간 2회추출한 것을 합하여 감압 농축하였다. 그 수율은 나타나 있다. 수득율은 시료의 중량을 얻은 량으로 나눈 값이다. 이 각 농축물로 각각 methanol, acetone, ethanol, butanol에서 가용성성분을 추출하여 시료로 하였다.

### 2. Silica Gel chromatography

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

## 제 7 절 시판 조제분유의 분석

### 1) PCA

상기 서술한 PCA 방법과 같게 실험하였다.

### 2) 질소분획

총질소는 분유시료들을 5%용액으로 조제하여 이 용액을 1ml를 분해시켜 각 질소분획을 항상 총질소 중 %로 표시하였고 방법은 Kjeldhal

법으로 정량하였다. NCN(non casein nitrogen)은 시료용액과 동량의 2M acetate buffer(pH4.6)을 서서히 가하여 섞은 후 30분간 방치후 여과하여 여액을 상기방법으로 질소를 정량한 후 총 질소중 비단백태 질소 %로 표시하였다. NPN(non proteic nitrogen)은 NCN의 경우에서처럼 시료용액과 동량의 24% TCA(trichloroacetic acid)를 가하여 단백질을 침전시킨 후 상기의 방법과 같이 정량 하였다.

### 3) SEM의 관찰(주사전자현미경)

주사전자현미경 관찰을 위한 전처리 각종 시료들은 개봉 즉시 Carbon black tape를 붙인 stub에 일정량 놓은 후 약하게 붙여 tape에 부착되지 않은 분유들을 붙여서 날려보낸 다음 JFC-1100 Eion sputter사용하여 20Kv의 전압으로 5분 동안 gold coating 한 후 주사전자현미경 관찰용 시료로 사용하였다. Cold coating 된 시료는 JEOL 회사 JSM-6400과 ISI 130의 주사전자현미경으로 가속전압 20Kv하에서 관찰하였다.

### 4) 전기영동

상기 서술한 전기영동의 방법과 동일한 조건하에서 실험하였다.

Table 1. List of samples infant formulas

Samples	Commercial names	Company names	Origin	Properties
A	Pregestimil	Mead johnson	USA	hypoallergy
B	Enfamil H. A	Mead johnson	USA	"
C	Galliagène	Gallia	France	"
D	Gallia H. A]	Gallia	France	"
E	Alma H	Blédina	France	"
F	Mliumel hypo antigeniqué	Nestlé	Swiss	"
G	Lait Guigoz	Milupa	Swiss	"
H	Lacto	Guigoz	France	"
I	Pregomine	Milupa	Swiss	"
J	Hope allergy	Namyang	Korea	hypoallergy
K	Mamma Ω	Maeil	Korea	Normal
L	Imperial S	Namyang	Korea	"
M	Agisarang	Namyang	Korea	"
N	Mamma D&A-1	Maeil	Korea	"
O	Low heat-1	Pateur	Korea	low heat treatment
P	Mamma's supplement powder	Pastuer	Korea	
Q	Nohikaka	Meiji	Japan	hypoallergy

## 제 7 절 특이식 제조

### 1. 流動食(fluid meal)의 제조

의식이 없는 환자나 의식이 있는 환자 모두에게 제공 가능한 식사이고 또한 정상적으로 소화할 수 없는 수술환자들에게도 제공될 수 있다. 원료 용해도 실험을 거치고 육을 가용화하여 첨가하여 제조한다.

### 2. 粥狀食(paste meal)

유동식에 starch를 첨가하여 죽처럼 제조한다. 그러므로 의식이 있는 환자에게 제공되어 저야 하며 소화전처리(pretreatment of digestion) 육의 소화도 용이하다. 원료 제조 후 혼합 배합하여 알레르기실험 통해 저 알레르기 확인 후 제품을 제조한다.

### 3. 고 단백질(high protein meal)

단백질 함량을 높여 제조하는 것으로 이를 위해 지방을 제거한다. 원료 제조후 혼합 배합하고 아미노산 정량과정과 아미노산의 최적 비율을 계산하여 알레르기 실험 통해 저 알레르기 확인 후 제품을 제조한다. 육단백을 용해도와 소화율을 위해 효소 전처리를 한다.

### 4. 저알레르기 우유

전년도에서 도출된 저알레르기 처리 공정을 거쳐 저알레르기 우유를 제조하나 것이다. 저 알레르기 우유를 개발한다 해도 유당불내증이 아이들에게는 문제가 될 수 있다. 이를 위해 유당을 발효과정을 통해 분해시킨 후 최종 알레르기 실험을 통해 제품을 제조한다. 음용유로 할 수 있고 각종 특이식 원료로 사용. 그러나 조제분유는 제외시킨다. 왜냐하면 조제분유는 이유식이 아니고 별도 독립 연구로 진행되어야 한다.

### 5. 이유식(weaning meal)

저알레르기 처리된 우유와 여기에 맛을 좋게 하기 위해 고기를 첨가하여 제조한다. 원료 제조 후 혼합 배합하여 알레르기실험 통해 저 알레르기 확인 후 제품을 제조한다.

## 제 8 절 의학적 평가

각각의 저 알레르기 처리된 시료에 대해 본 연구에서 제조한 항혈청(4-5)과 환자혈청(1)을 Guniea pig 등에 주사하여 PCA로 저 알레르기 처리된 각 항원을 정맥에 투여 blue spot으로 allergy 유무 판정한다. 즉 환자혈청에 대한 PCA의 결과가 저 알레르기 처리된 항원에 대해 반응을 보이지 않으면 또 다른 환자혈청(충분한 양 4-5 정도)으로 PCA를 실시하였다. 결과가 5개 중 몇 개에서 저 알레르기 처리된 항원에 대해 반응이 있는지 판단하였다. 만약 5개중 1개라도 나오면 저 알레르기 처리된 반응으로 볼 수 있다. 이것은 1개라도 나온다는 것은 저 알레르기 처리가 된 것을 의미할 수 있다. 그러나 어떠한 반응도 일어나지 않으면 그것은 알레르기를 억제하지 못함을 나타낸다.

또다른 방법으로 western blotting을 실시하였다. 그 방법은 상기에 기술한 법과 같다.

## 제 9 절 알러젠 추출법 및 안정성 평가

### 1. 추출방법

allergy식품으로 판정된 식품들에서 allergy를 일으키는 allergen을 분리하여 prick test용 개발에 사용하고 또 allergen의 이화학적 특성을 규정하여 저 allergy식품을 개발목적으로 조정제를 실시하였다.

#### (1) Allergen의 용매에 의한 추출

각 식육을 아래 용매로 30분간 교반한 후 추출하였다. 여기에서는 allergen의 용해도에 의한 분획이 될 것이다.

- Ether                      · 1% KCl                      · 0.25N NaOH
- 80% ethanol              · 1% MgSO<sub>4</sub>
- Butanol                      · 2% NaCl

#### (2) 분자량에 의한 분획

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

#### (3) 전기영동

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

#### (4) Lowry법에 의한 단백질 정량

각 샘플 0.5ml을 10% SDS 용액 9.5ml에 혼합한 후 거기서 150ul를 위해 시험관에 분주한다 그런 후에 증류수로 총 volume이 1200ul가 되게 혼합하였다. 그런다음 각 시험관에 CTC working 용액을 1200ul를 첨가한 후 교반하였다. 그런 후 20% Folin-ciocalteu 용액을 600ul 첨가하고 30분동안 정치한 다음 흡광도를 A750에서 측정하였다. standard curve는 Bovine Serum Albumin의 농도별로 흡광도 측정하여 일차방정식을 얻은 후 계산에 사용하였다.

### 2. 안정성 평가

#### (1) 물리적 안정성

각종 식육과 우유를 0.1M potassium phosphate buffer pH7.0 용액으로 1% proteins 용액을 만들어서 다시 0.01% protein; 0.9% NaCl가 들어가게 제조한 후 각기 0.4% phenol과 50% glycerol를 넣어서 시료로 하였다. 모든 시료 제조에 사용한 증류수는 3차 증류수를 사용하였으며 제조 작업은 Hood 안에서 무균 조작으로 진행하였다. 시료들을 36도 1-4주간 저장하여 침전유무를 관찰하고 전기영동을 실시하여 전기영동상에 변화가 없으면 PCA를 실시하여 본다.

## (2) 생물학적 안정성

0.9% NaCl(50% glycerin 포함)와 0.4% phenol 용액을 만들어 각각 Guinea pig의 skin에 주사하여 4시간, 8시간 후 각기 skin을 절제하여 얻은 시료를 처리하여 SEM을 관찰하였다.

## 제 10 절 Volatile Basic Nitrogen 변화

신선한 각종 식육을 36℃에서 하루, 이틀 정치한 것을 정확히 10g을 달아서 이틀 정치한 것에 증류수 50ml를 넣고 잘 저어 섞어 30분간 침출하고 여과하였다. 여과액을 5% 황산용액을 사용하여 약산성으로 중화시킨 후 증류수를 넣어 일정량으로 하여 시험용액으로 하였다. 확산기를 약간 기울여 놓고 외실의 아래쪽에 시험용액 1.00ml를 정밀하게 넣은 다음 내실에 0.01N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00ml를 같은 방법으로 정밀하게 넣고 덮개의 갈아 맞추는 부분에 기밀제 소량을 고루 바른 다음 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 약 1ml를 외실의 윗쪽에 재빨리 넣고 즉시 덮개를 덮어 클립으로 고정하고 확산기를 전후좌우로 기울이면서 조용히 회전하여 외실 외실의 시험용액과 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액을 잘섞어(이때 외실의 용액과 내실의 용액이 섞이지 않도록 주의) 25°에서 1시간 정치하였다. 1시간 후 덮개를 열고 내실의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액에 Brünswik시액 한방울을 넣고 마이크로뷰렛을 사용하여 0.01N-NaOH용액으로 적정하여 그 2회 평균치(a ml)를 구한후 VBN량을 구하였다. 이 연구는 돈육과 계육이 상온에서 고기의 부패정도를 알아봄으로써 amine류 발생을 예측하기 위함이다.

## 제 11 절 발효유에서 항 알레르기 인자 검색(문용일, 우석대학교)

### 1. 유산균 배양

#### - 공시균주

유산균발효배양액에서 최대 단백질 분해 조건을 탐색하기 위하여 사용

된 菌株는 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* kctc 1121 (이하 *Lactobacillus bulgaricus*fk 약함) 및 *Streptococcus thermophilus* kctc 2185 (이하 *Streptococcus thermophilus* 라 약함)을 본 실험의 공시菌株로 使用하였다.

- 발효배양액으로부터의 유청분리

멸균 10% 환원탈지유에 각 實驗菌株를 1%접종한후 36시간 배양한 배양액으로부터 4℃, 9000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 유청을 분리하였다.

- Gel filtration chromatography에 의한 유청의 분별 원심분리한 유청의 Sephadex G-50(pharmacia, Sweden)에 의한 분별은 Baily(1967) 및 Yaguchi와 Rose(1971)등의 방법에 따라 gel입자를 20℃에서 3시간 이상 증류수에 침지시켜 水和시키면서 미세입자를 제거하고 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 평형상태가 되도록 씻어준 후 0.9×95cm의 column에 90cm까지 충전시킨 다음 Sephadex 수지의 평형을 위하여 약 500ml의 buffer를 흘려주었다. 이와같이 준비된 column에 시료(50mg/2ml)를 주입시킨 후 buffer의 유출속도가 매 시간당 20ml가 되도록 조절하여 용출시켰다. Gel filtration을 통한 분획물은 Tube당 5ml를 취하고 280nm(JASCO社 製 Spectrophotometer)에서 흡광도를 측정하였다.

## 2. Plasmid 검사

### (1) 사용미생물

이 연구에 사용된 *Streptococcus thermophilus*균주는 한국생명공학 연구원유전자은행(KCTC)로부터 분양받은 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185 균주로 사용균주는 11%환원 탈지유에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

### (2) Acridine Orange Curing

환원탈지유 배지에 보관중인 실험균주는 M<sub>17</sub>-glucose broth에서 몇 차례 계대 배양한 후 ml당 50 및 90μg의 Acridine Orange(AO)를 함유하고 있는 M<sub>17</sub>-glucose broth에 1%접종하여 24시간 배양한 후 동량의 AO를 함유한 배지에 1% 접종하여 계대 배양하였다.

배양액을 0.85%(w/v)NaCl농도의 생리적 식염수로 희석한 후 BCP-lactose indicator agar에서 평판도말하고 30℃에서 40시간 배양하여 작고 흰 colony를 선발하였다.

Table 2. The composition of M<sub>17</sub>-glucose medium

Phytone peptone	5.0g
-----------------	------



Polypeptone	5.0g
Yeast extract	2.5g
Beef extract	5.0g
Lactose	5.0g
Glucose	15g
Ascorbic acid	0.5g
$\beta$ -Disoium acid	19g
1.0M MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0ml
D.W.	1 ℓ

Table 3. The composition of BCP agar

Yeast extract	2.5g
Peptone, Proteose	5.0g
Dextrose	1.0g
Tween 80	1.0g
L-cysteine · HCl	0.1g
B.C.P.	0.04g
Agar	15g
D.W.	1 ℓ

Adjust to pH 6.9

### (3) Plasmid 검사

공시균주 및 BCP agar에서 선발된 돌연변이주의 plasmid는 Anderson과 Mckay(1983)의 방법에 따라 다음 표시된 순서에 의해서 분리하였으며 plasmid DNA의 침전에는 isopropanol 대신 2 volume의 ethanol을 사용하였다. Plasmid DNA의 분자량 측정은 *E.coli* V517의 plasmid를 표준으로 하여 Macrina등(1978)의 방법에 따라 측정하였다.

Cell incubation for 1 day at 30°C

→ Centrifugation 5,000rpm for 10min

→ Wash with 1ml of TES buffer

→ Transfer to Eppendorf tube

→ Centrifugation at 5,000rpm for 10min

→ Add 379 $\mu$ l of 6.7% sucrose-50mM Tris-1mM EDTA(pH 8.0)soln

→ Voltex and heat to 37°C

- Add 96.5 $\mu$ l of lysozyme soln(10mg/ml in 25mM Tris(pH 8.0)soln
- Vortex
- Add 27.6 $\mu$ l of SDS soln(20% (w/v) in 50mM Tris-20mM EDTA, pH 8.0}
- Mix immediately gently
- Incubation at 37°C for 5-10min
- Vortex at highest setting for 30sec
- Add 27.6 $\mu$ l of 3.0 Fresh NaOH
- Add 700 $\mu$ l of phenol saturated with 3% NaCl
- Mix thoroughly
- Centrifuge at 12,000g for 5min
- Transfer upper phase to New Eppendorf tube
- Add 700 $\mu$ l of chloroform : isoamyl alcohol
- Centrifuge at 12,000g for 5min
- Transfer upper phase to New Eppendorf tube
- Add 1 volume of EtOH 2 volume
- Incubate below 0°C over 30min
- Centrifuge at 12,000g for 5min
- Remove EtOH with microprpette
- Set in vacuum desiccator for a while to remove EtOH completely
- Add 18 $\mu$ l of TES buffer and 2 $\mu$ l of RNase soln
- Incubate at 37°C for 40-60min
- Add 4 $\mu$ l of gel loading buffer
- Insert 17 $\mu$ l of sample to gel
- Electrophoresis 100 v at 60-70mA for 3hr
- Transfer to Ethidium bromide soln(0.5 $\mu$ g/ml) for 1hr to stain the gel
- Photograph

## ❁ 연구결과

### 제 1 절 시료들의 면역학의 기본 조작

#### 1. 항체 형성 확인을 위한 한천 이중 확산법

항원으로 표시된 그림 ①,②,③은 시료의 위치와 농도를 나타낸다. 사진 ④,⑤,⑥은  $\beta$ -casein의 항혈청이 제조되었음을 확인되었다. 모든 이중확산의 위치 5번은 면역전에 제혈한 혈청으로 공히 항원과 침전반응대를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 Lysozyme, Lactoferrin,  $\beta$ -Lactoglobulin에서 마찬가지로 항체의 형성이 확인되었고 항혈청이 정확히 제조되었음을 시각적으로 확인한다.

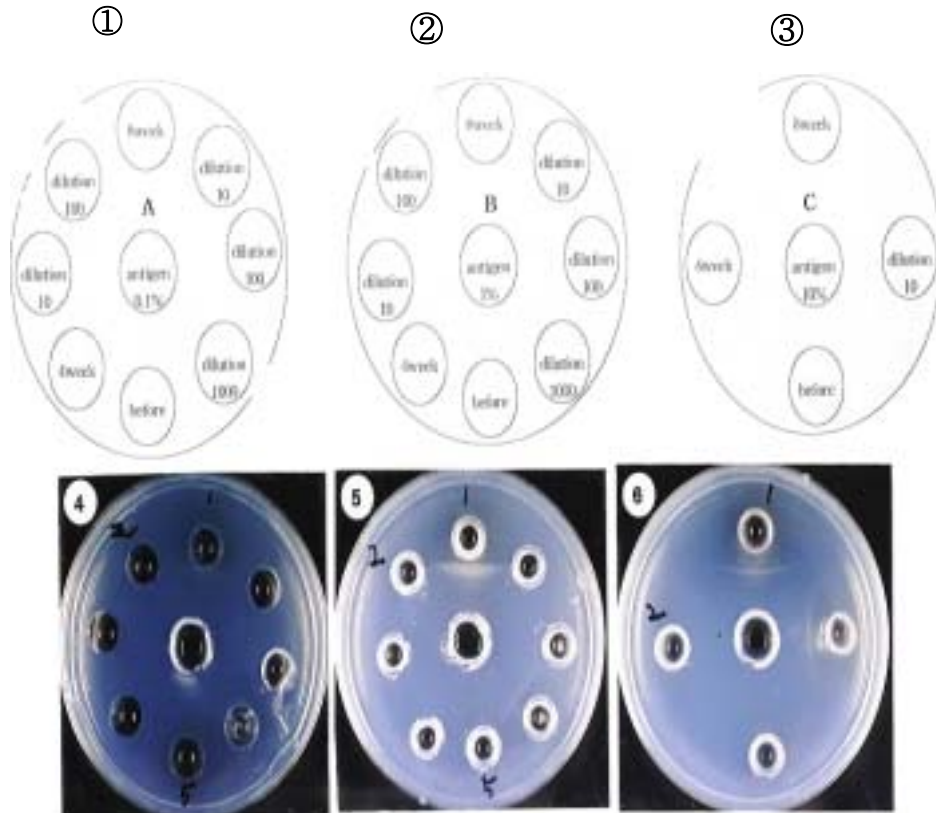


Plate I

Plate I  
 Explanation : micrograph 1. A. Different serum dilution in case of 0.1% antigen  
 micrograph 2. B. Different serum dilution in case of 1% antigen  
 micrograph 3. C. Different serum dilution in case of 10% antigen  
 micrograph 4. Double diffusion of  $\beta$ -casein at 0.1% antigen (A)  
 micrograph 5. Double diffusion of  $\beta$ -casein at 1% antigen (B)  
 micrograph 6. Double diffusion of  $\beta$ -casein at 10% antigen (C)

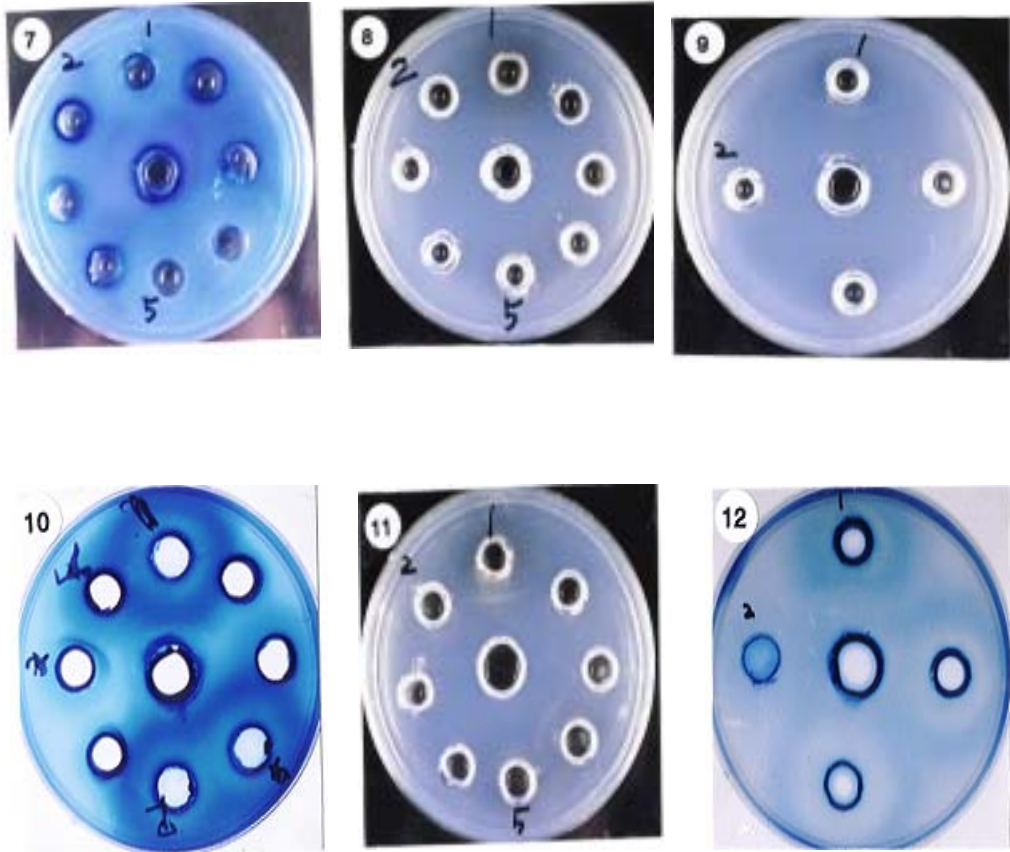


plate II

plate II

- micrograph 7. Double diffusion of lysozyme at 0.1% antigen (A)
- micrograph 8. Double diffusion of lysozyme at 1% antigen (B)
- micrograph 9. Double diffusion of lysozyme at 10% antigen (C)
- micrograph 10. Double diffusion of lactoferin at 0.1% antigen (A)
- micrograph 11. Double diffusion of lactoferin at 1% antigen (B)
- micrograph 12. Double diffusion of lactoferin at 10% antigen (C)

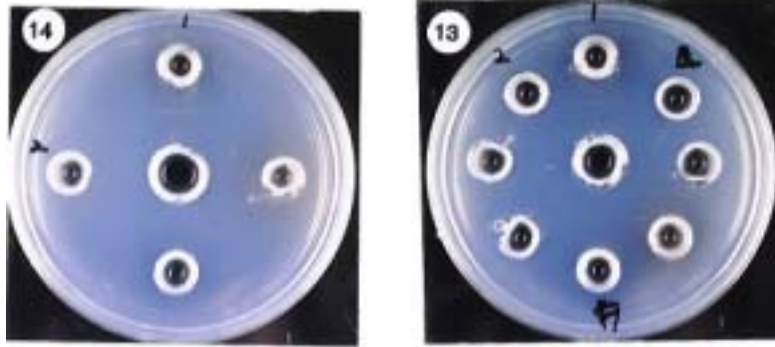


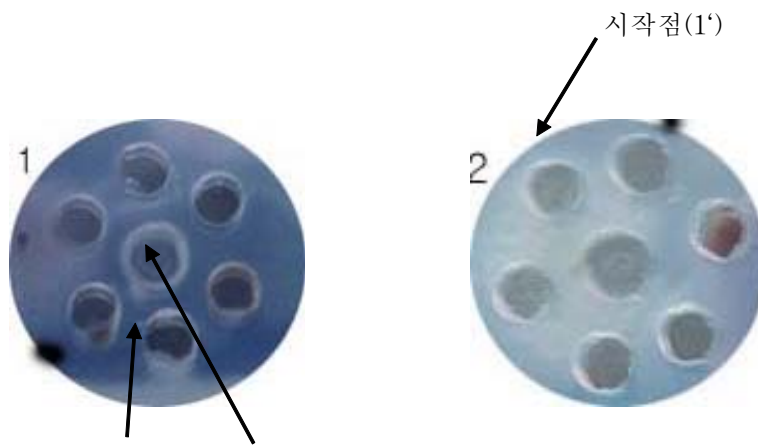
plate III

plate III

micrograph 13. Double diffusion of  $\beta$ -lactoglobulin at 1% antigen (B)

micrograph 14. Double diffusion of  $\beta$ -lactoglobulin at 10% antigen (C)

Fig 1. Double diffusion of Lysozyme, Lactoferin,  $\beta$ -Lactoglobulin



항체, 시작점(1'-6') 항원

Fig 2. Double diffusion of duck meat.

Antigen number - 1; 오리간, 2; 오리심장

Antibody - 1'; 오리위, 2'; 닭간, 3'; 오리다리, 4'; 닭위, 5'; 오리허파, 6'; 닭허파 (시계 반대방향으로)

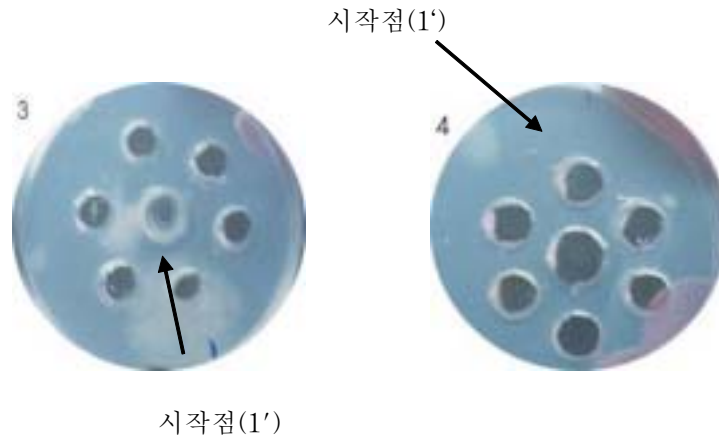


Fig 3. Double diffusion of chicken meat.

Antigen number - 3; 닭간, 4; 닭가슴

Antibody - 1'; 오리위, 2'; 닭간, 3'; 오리다리, 4'; 닭위, 5'; 오리허파, 6'; 닭허파 (시계 반대방향으로)

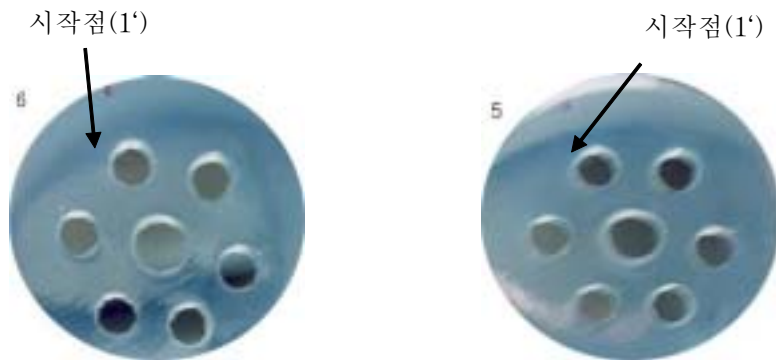


Fig 4. Double diffusion of beef meat.

Antigen number - 5; 소 윗등심, 4; 소심장

Antibody - 1'; 우둔살, 2'; 앞다리살, 3'; 채끝살, 4'; 도가니살, 5'; 십이지장, 6'; 머리고기(불살) (시계 반대방향으로)

토끼에서 면역 후 혈청이 항체의 형성유무를 알기 위한 실험이다.

Fig 2, 3 그리고 4에서 보면 각 항원(가운데)에 대한 각 혈청(바깥쪽)의 띠가 형성된 것을 볼 수 있다. 먼저 오리의 경우를 보면 Fig 2에서 1번인 오리간에서는 오리허파에서 반응이 일어났으며 2번인 오리심장에서 역시 오리허파에서 나타난 것을 볼 수 있다.

닭의 경우에는 Fig 3에서 보듯이 닭간에서는 닭허파에서 공통반응이 일어났으며 닭가슴에서는 닭허파에서도 나타났으며 또한 오리허파에서도 나타났다. 소의 경우는 Fig 4에서 보듯이, 소윗등심에서는 우둔살, 앞다리, 채끝살, 머리고기(불살)에서 반응이 일어났다. 또한 채끝살하고 머리고기(불살)에서 반응이 일어난 것을 볼 수 있다.

또한 돼지의 경우 역시 간에서는 족발(살코기), 간, 허파, 소장, 갈비, 삼겹살, 심장에서 나타났으며, 항원을 신장으로 했을 때 족발(살코기)와 소장 그리고 허파에서 반응이 일어났다(date not shown).

## 2. 항혈청 생성역가

Table 4. Titration of PCA for anti-serum according to immunity times(week)

면역 시간 (주)	$\beta$ -casein	소 도가니살	소 등심
0주	-	-	-
4주	100	50	-
6주	200	150	50
8주(control)	500	350	100

면역 시간에 따른 항 혈청 생산역가는 Table 4에 나타나 있다. 이 Table에서 보듯이 유단백인  $\beta$ -casein에서 그 항 혈청 생산역가가 가장 많이 나타났으며 그 다음이 소 도가니살, 소 등심의 순으로 나타났다. 이것은 중요하다. 왜냐하면 알레르기와 관계가 깊은 IgE의 양에 관계가 되기 때문이다.

## 제 2 절 시료들의 알러젠성 평가

### 1. 축산물 단백질의 PCA

#### 1) 식육 부위별

Table 5. The results of PCA according to each part of meat

소	PCA결과	돼지	PCA결과	오리, 닭	PCA결과
족발(가죽)	●	족발(가죽)	●	오리위	×
간	●	족발(고기)	●	오리다리	●
등심	●	족발(흰살)	●	오리허파	●
심장	●	등심	●	오리신장	×
신장	●	안심	×	오리심장	●
머리(뇌)	●	앞다리	●	오리간	×
허	●	뒷다리	●	오리가슴	●
등골	×	갈비	●	오리내장	×
허파	●	삼겹살	×	닭간	●
아롱사태	●	목심	●	닭다리	●
족발(고기)	●	간	●	닭위	×
치마살	●	심장	●	닭허파	●
우둔살	●	신장	●	닭신장	×
앞다리살	●	허파	●	닭심장	●
채끝살	●	볼테기살	●	닭가슴	●
도가니살	●	위	×	닭내장	×
십이지장	●	소장	●		
갈비살	●				
머리고기	●				
목심살	●				
위(천엽)	×				
양	●				

●표시 반응있어남 ; ×표시 반응 없음

Table 5는 모든 고기의 부위에 대한 PCA 결과로 allergy 유무를 확인하기 위한 것이다. 이 Table에서 보듯이 소의 경우에 있어서 대부분의 부위에서 allergy가 인정됨을 보여 주고 있다. 그러나 등골과 천엽위에서는 그렇지 않음을 알 수 있다. 돼지의 경우 역시 마찬가지로 대부분 allergy가 인정되었다. 그러나 삼겹살과 안심, 위에서는 allergy가 없는 것으로 나타났다. 오리와 닭의 경우에는 다리, 허파, 심장, 가슴등에서 똑같이 allergy를 보이고 있으며 닭의 경우는 간에서도 반응을 보이고 있다.



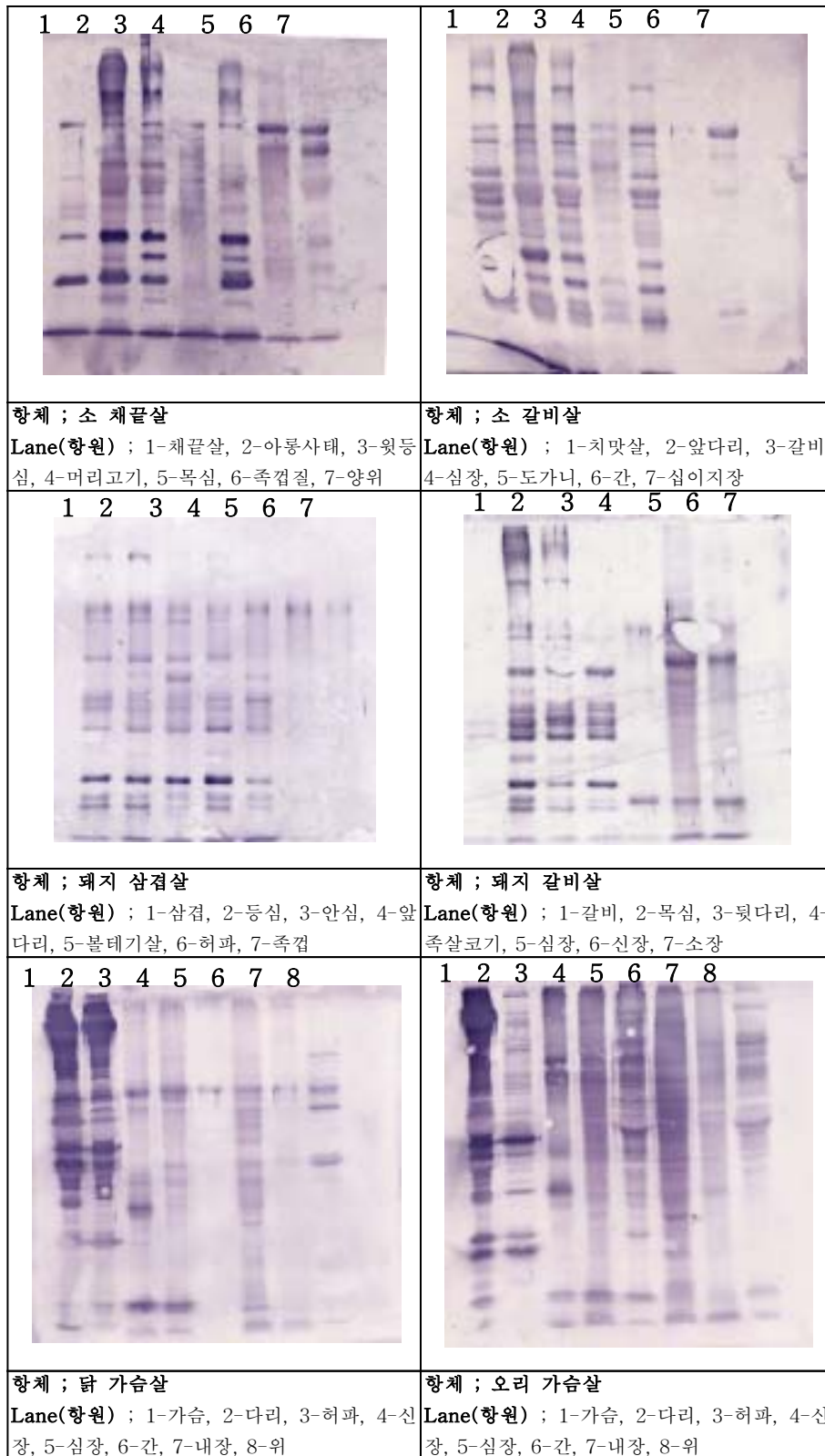


Fig 5. Change of western blotting according to each region of meat.

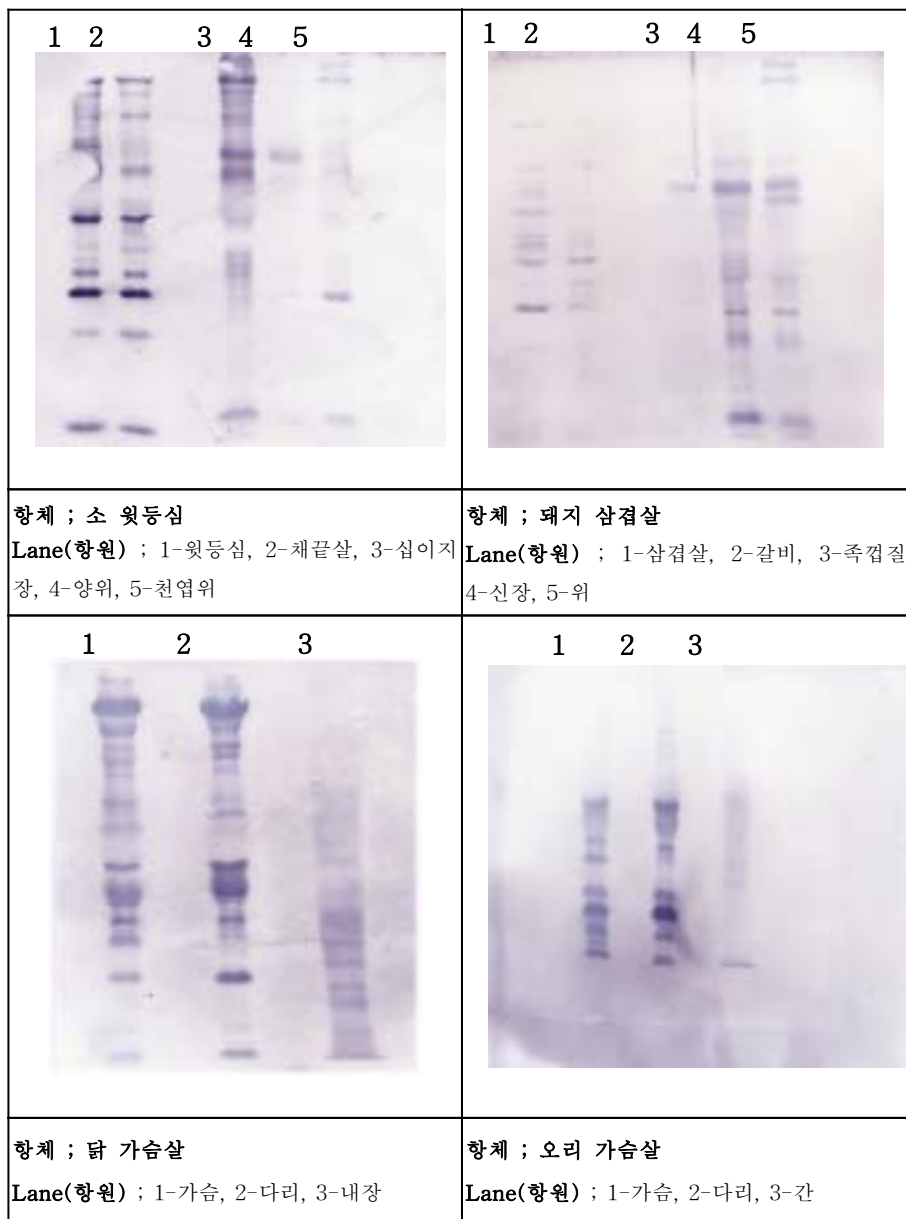


Fig 6. Change of western blotting according to each region of meat(representative antigen).

Fig 5는 각 축종에 대해 각각의 부위별 항원에 대한 western blotting의 변화를 나타냈다. 여기에서 보듯이 소고기의 대표항체(채끝살과 갈비살)에 대한 그 항원에 있어서는 반응을 나타내고 있다. 물론 다른 축종에서도 같은 결과를 보이고 있다(Fig 5). 또한 고기부분과 내장이나 다른 부분의 공통항원성 반응의 결과도 같이 판단할 수 있다. 즉 Fig 5에서 보면 가슴등 살부위와 내장등의 부위

와도 공통반응이 일어나는 않음을 볼 수 있다. 이것은 살부위에 있는 단백질의 구조와 내장등 부위에 있는 단백질 구조가 다르기 때문이라 볼 수 있다.

Fig 6은 그 대표적 항원에 대해서만 나타낸 결과이다. 이 Fig에서 보면 살부위와 내장 등의 부위의 차이가 있다는 것을 더 확실하게 알 수 있다. 즉 공통항원성이 없음을 보여주고 있다.

## 2) 우유

우유에 대한 allergy는 이미 잘 알려져 있는 사실이다. 아래 Table 6와 Fig 7에서 보듯이 우유와 유단백질 즉 casein이나 유청단백질 모두에게서 알러젠성을 나타내고 있는 것을 볼 수 있다.

Table 6. The results of PCA in milk and milk proteins.

	PCA 결과		PCA 결과
우유	●	albumin bovine	●
$\alpha$ -casein	●	$\beta$ -lactoglobulin A	●
$\kappa$ -casein	●	lactoferrin	●
$\beta$ -casein	●	$\beta$ -lactoglobulin B	●
		$\alpha$ -lactalbumin	●

●표시 반응일어남 ; ×표시 반응 없음

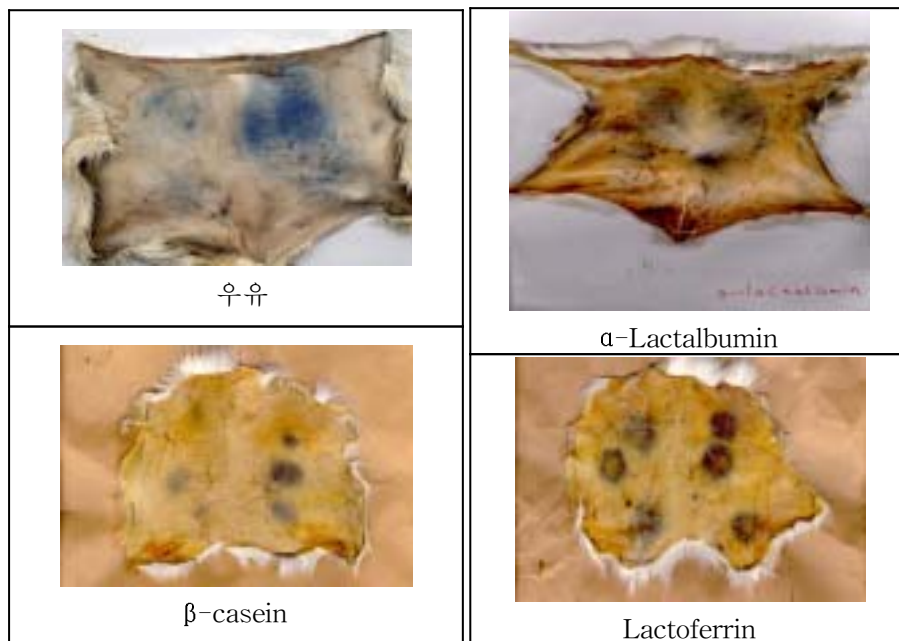


Fig 7. The skin of PCA in milk and milk proteins.

2) 유단백의 western blotting의 변화

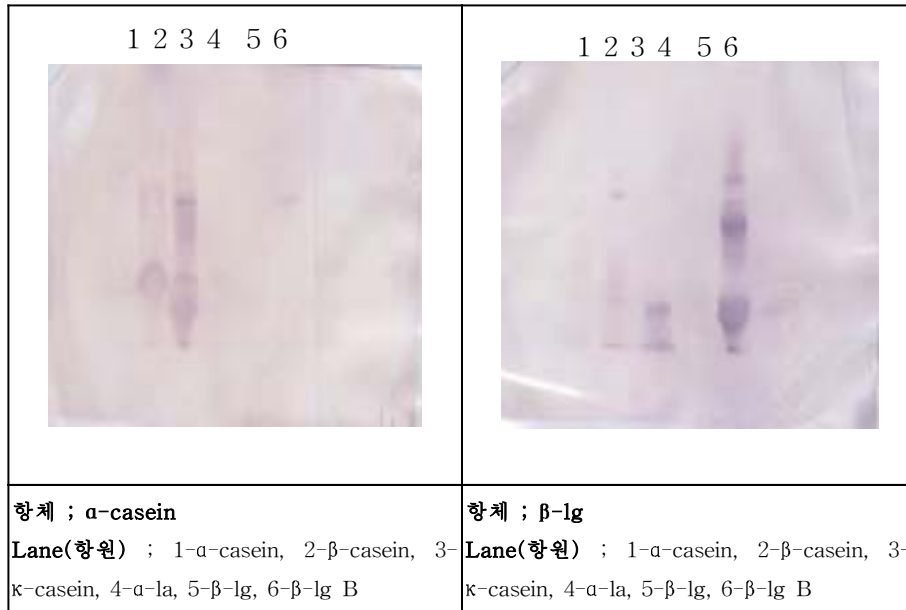


Fig 8. Change of western blotting on the milk proteins

각 유단백에 대한 반응의 결과는 Fig 8에 나타나 있다. band의 형성은 항원과 항체가 반응하여 생긴 것이다. 이로써 어떤 단백질이 알레르기가 있는지 알 수 있다. 이것을 보면 각 lane  $\alpha$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg,  $\beta$ -Lg B에 대한 항체  $\alpha$ -CN의 반응은  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein 그리고  $\beta$ -lg에서 반응을 보여 알레르기가 인정된다고 할 수 있으며 Fig 6의 B에서는 항체를  $\beta$ -lg으로 반응시켜 보았을 때  $\beta$ -casein과  $\kappa$ -casein  $\beta$ -lg, 그리고  $\beta$ -lg B에서 알레르기가 인정된다고 할 수 있다.

## 2. PCA와 anaphylaxis의 관계

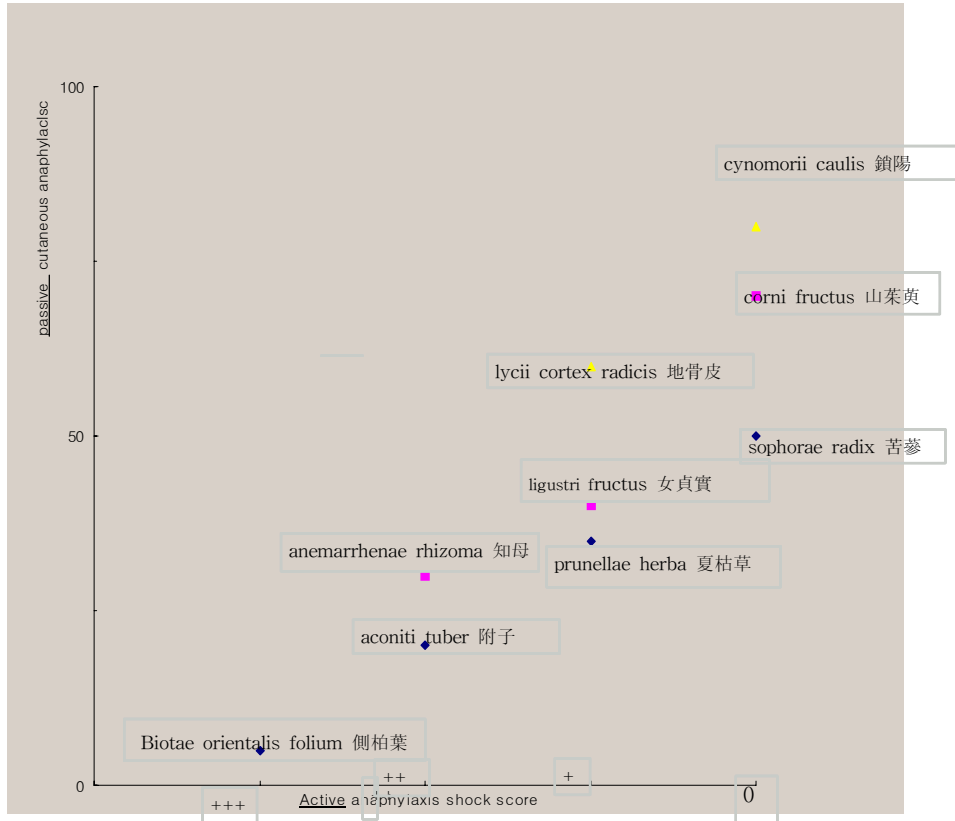


Fig 9. Change of western blotting on the milk proteins

PCA와 shock score의 상관관계는 Fig. 9와 같이 나타났다. PCA 억제율 shock score의 등급과 역으로 비례하였다. 이것으로써 PCA에서 나타난 局所적 변화가 전신적변화 shock score와 비례하는 것으로 나타났다.

### 제 3 절 식육과 우유의 공통항원성 평가

#### 1. 식육

##### (1) 축내 간 상호교차 반응

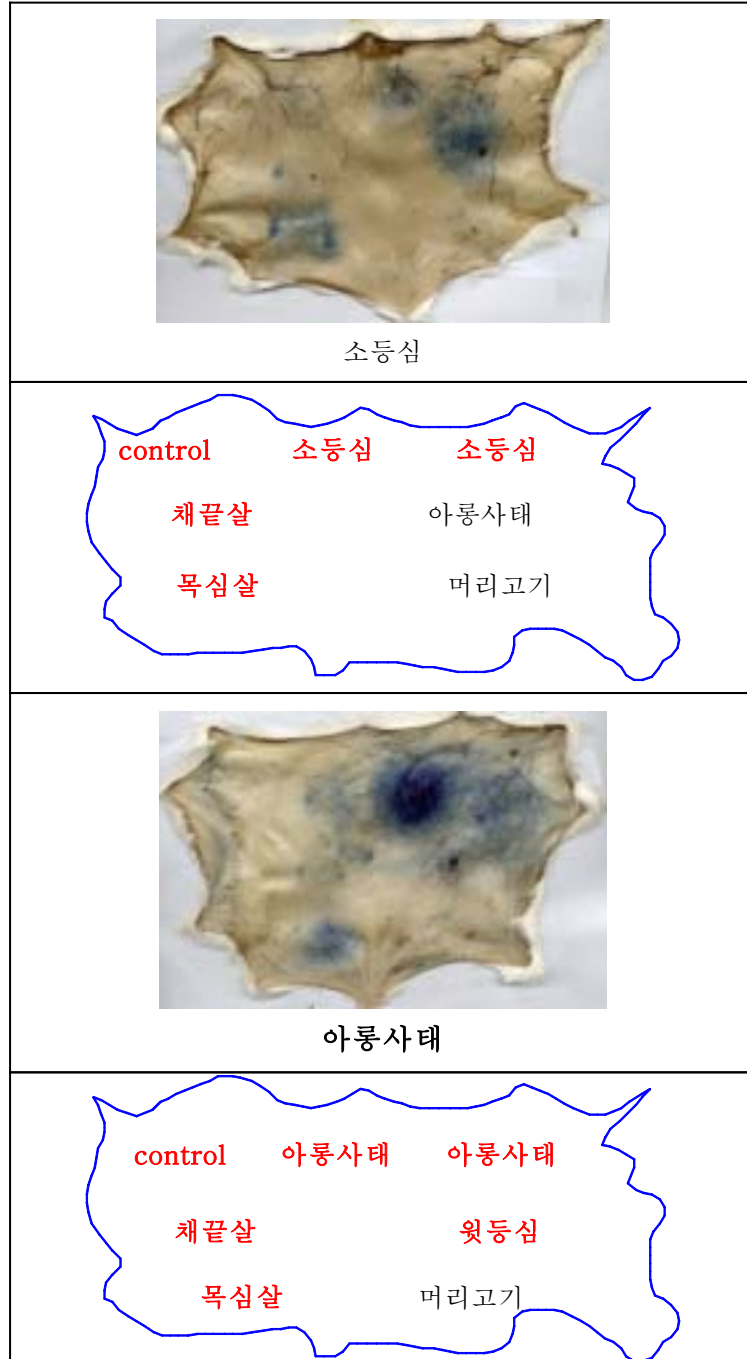


Fig 10. The skin of PCA on cross reaction in cow meat(A)

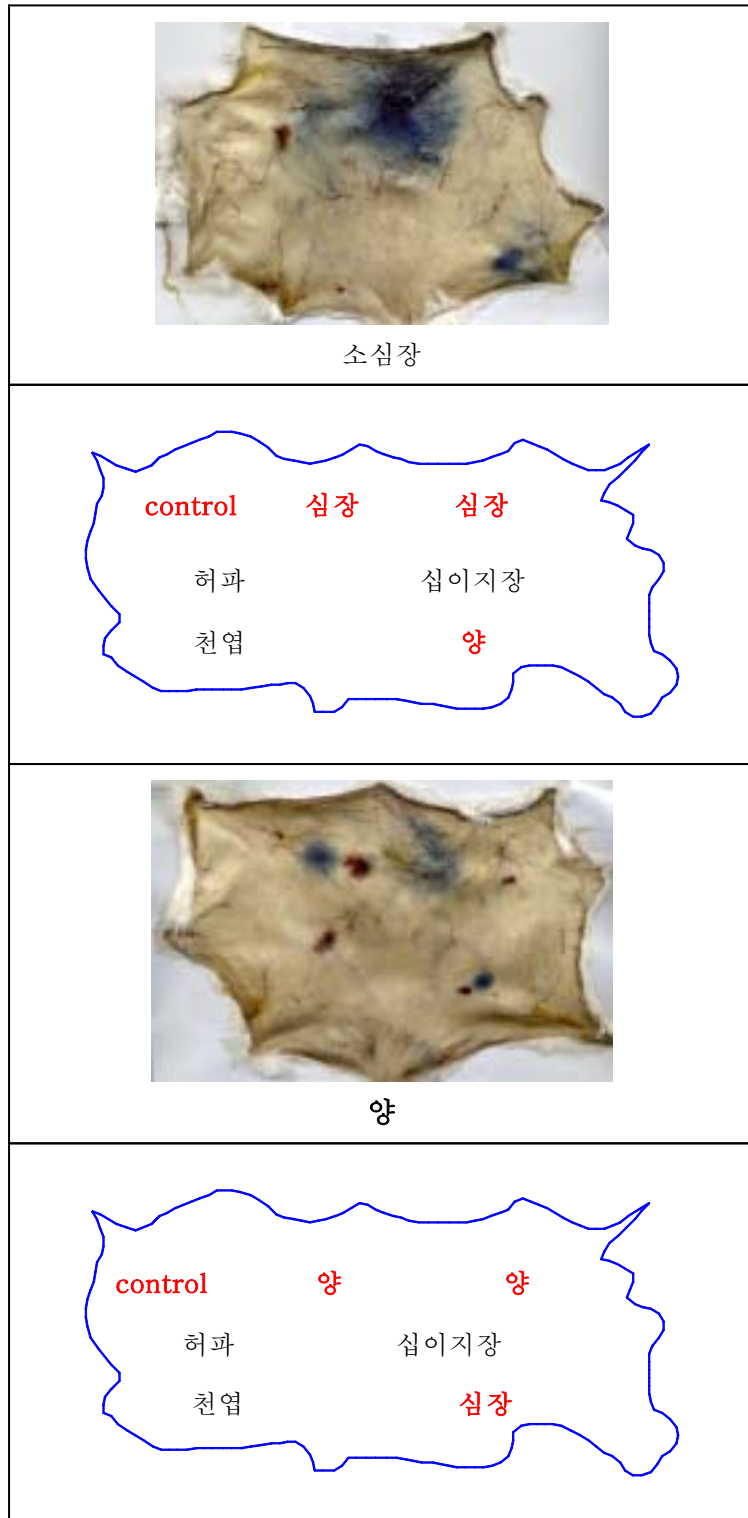


Fig 11. The skin of PCA on cross reaction in beef(B)

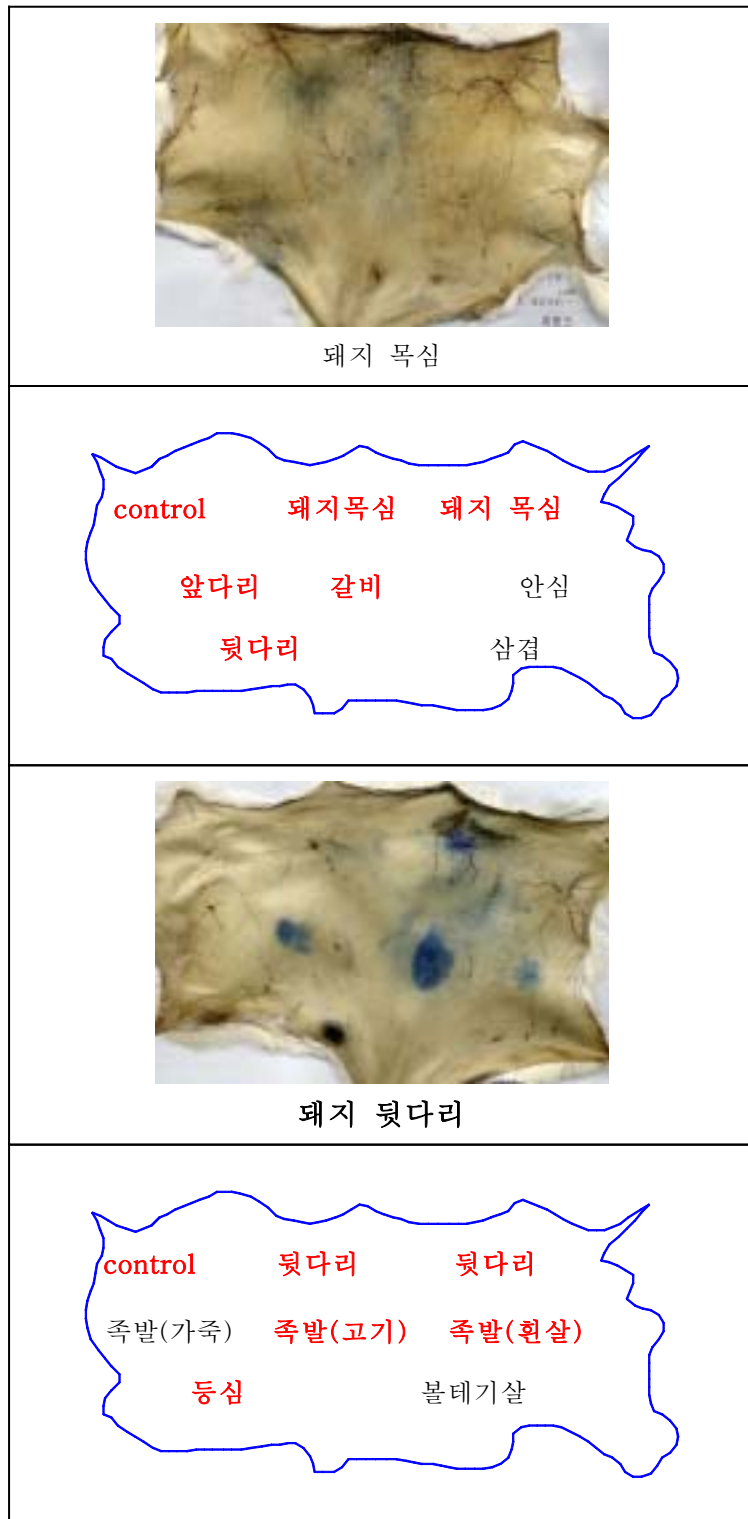


Fig 12. The skin of PCA on cross reaction in pork(A)



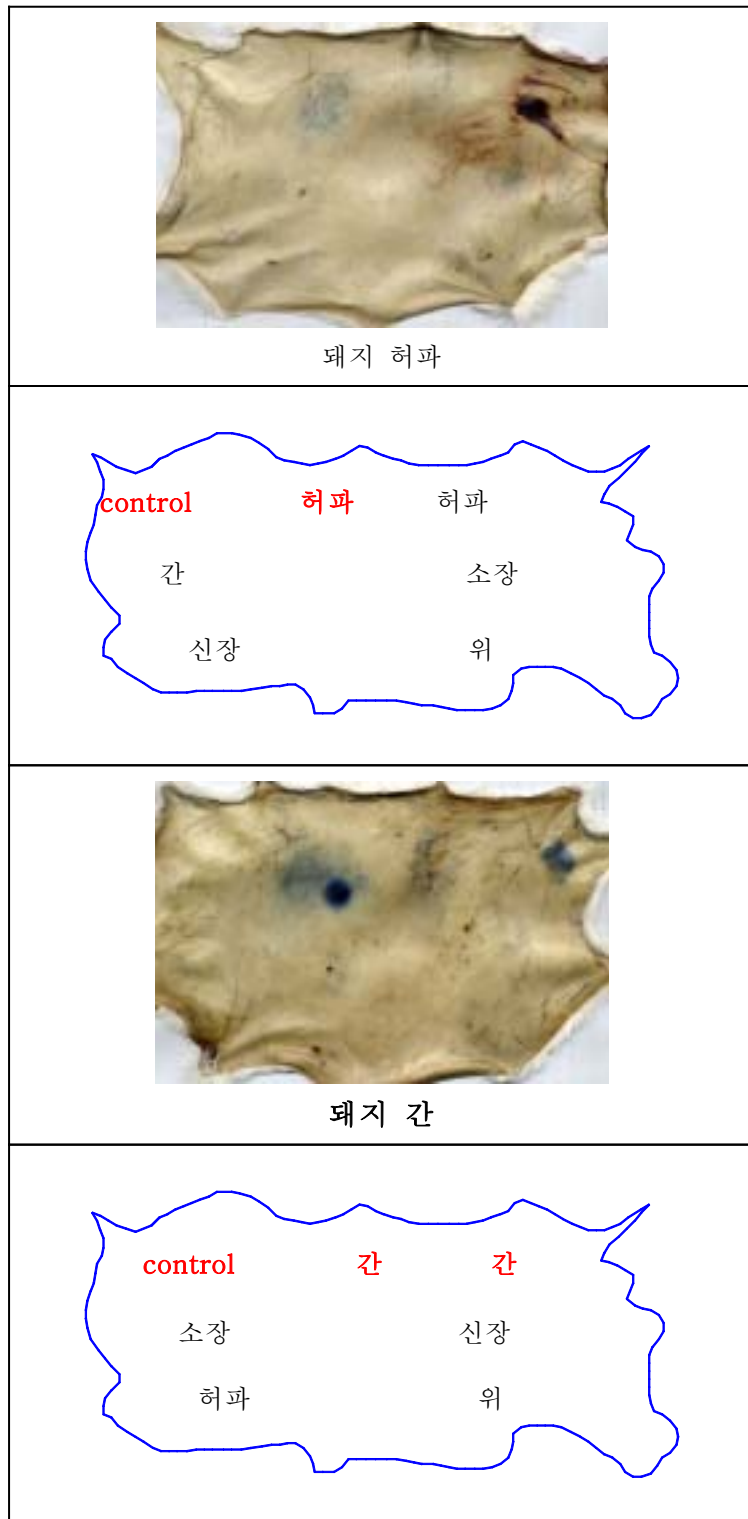


Fig 13. The skin of PCA on cross reaction in pork(B)

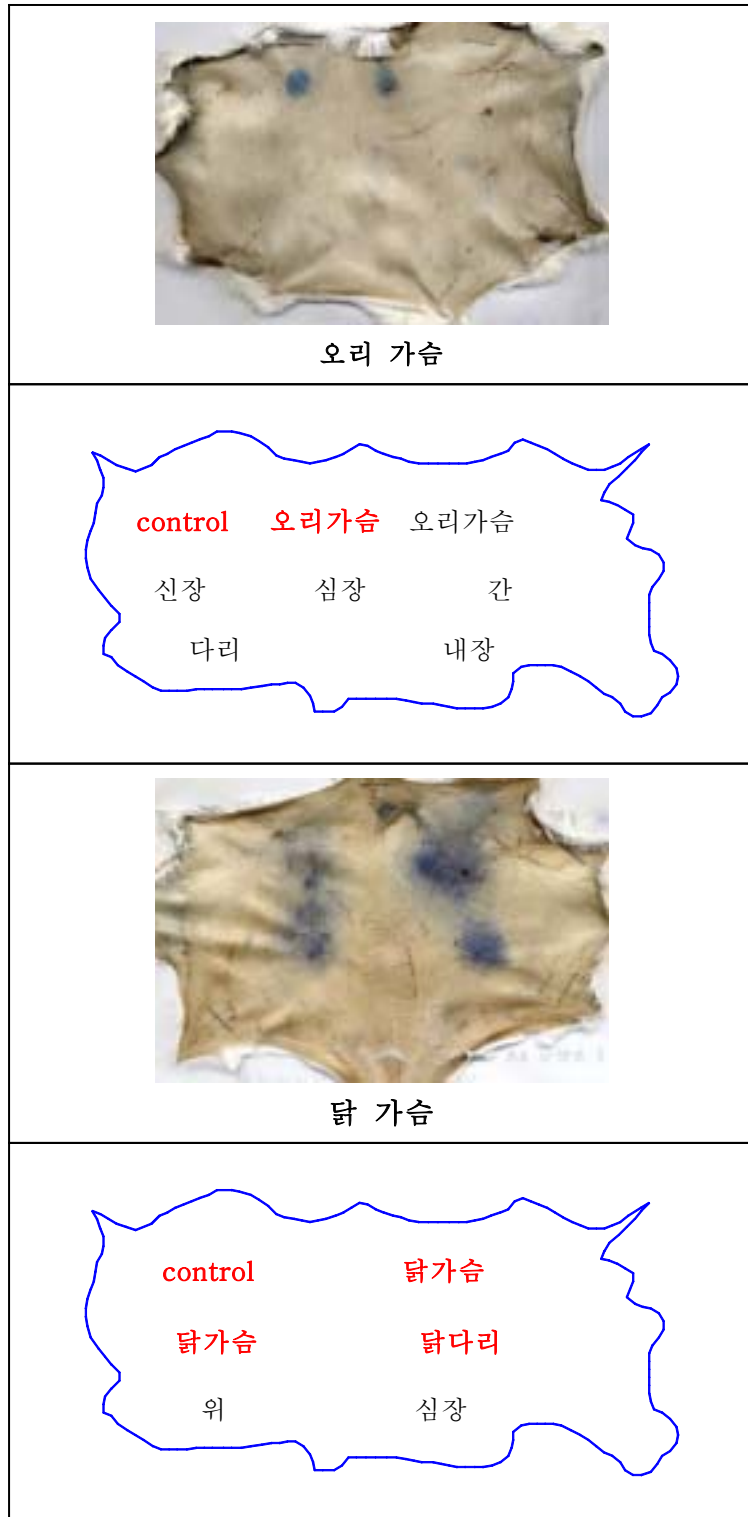


Fig 14. The skin of PCA on cross reaction in chicken and duck

먼저 소고기에서 상호교차반응의 결과는 Fig 10과 11에 나타나 있다. 소등심과 그 외 채끝, 아롱사태, 목심, 머리고기에 대한 공통반응성은 채끝과 목심에서 반응이 나타났다. 아롱사태에 대해서는 채끝살, 윗등심, 목심에서 그 반응이 나타났다(Fig 10). 또한 소심장에 대한 공통반응성은 양위에서만 나타나는 것을 볼 수 있었음 양위에 대해서도 역시 마찬가지로 심장에서만 공통반응성이 인정되었다.

돼지의 경우에 있어서는 Fig 12와 13에 나타나 있다. 돼지 목심의 경우 앞다리, 갈비, 뒷다리등 같은 살 부위에서 공통반응성이 인정되었으며 뒷다리의 경에는 족살코기, 족 흰살, 등심에서 그 반응이 인정되었다(Fig 12). 또한 돼지 허파에 대한 그 반응성은 존재하지 않았으며 간의 경우 역시 마찬가지로의 결과를 보이고 있다(Fig 13).

마지막으로 오리와 닭의 경우는 Fig 14에 나타나 있다. 여기에서 보면 오리와 닭 모두 공통반응성은 살부위에서만 공통반응성을 보이고 있다.

종합해보면 모든 축종내 공통반응성은 같은 단백질 구조를 가지는 부위끼리 나타나는 것을 볼 수 있다.

이러한 결과는 앞에서 기술한 western blotting의 결과(Fig 5와 6)와 비슷한 결과를 보이는 있는 것을 알 수 있다.

(2) 축종 간 상호교차 반응

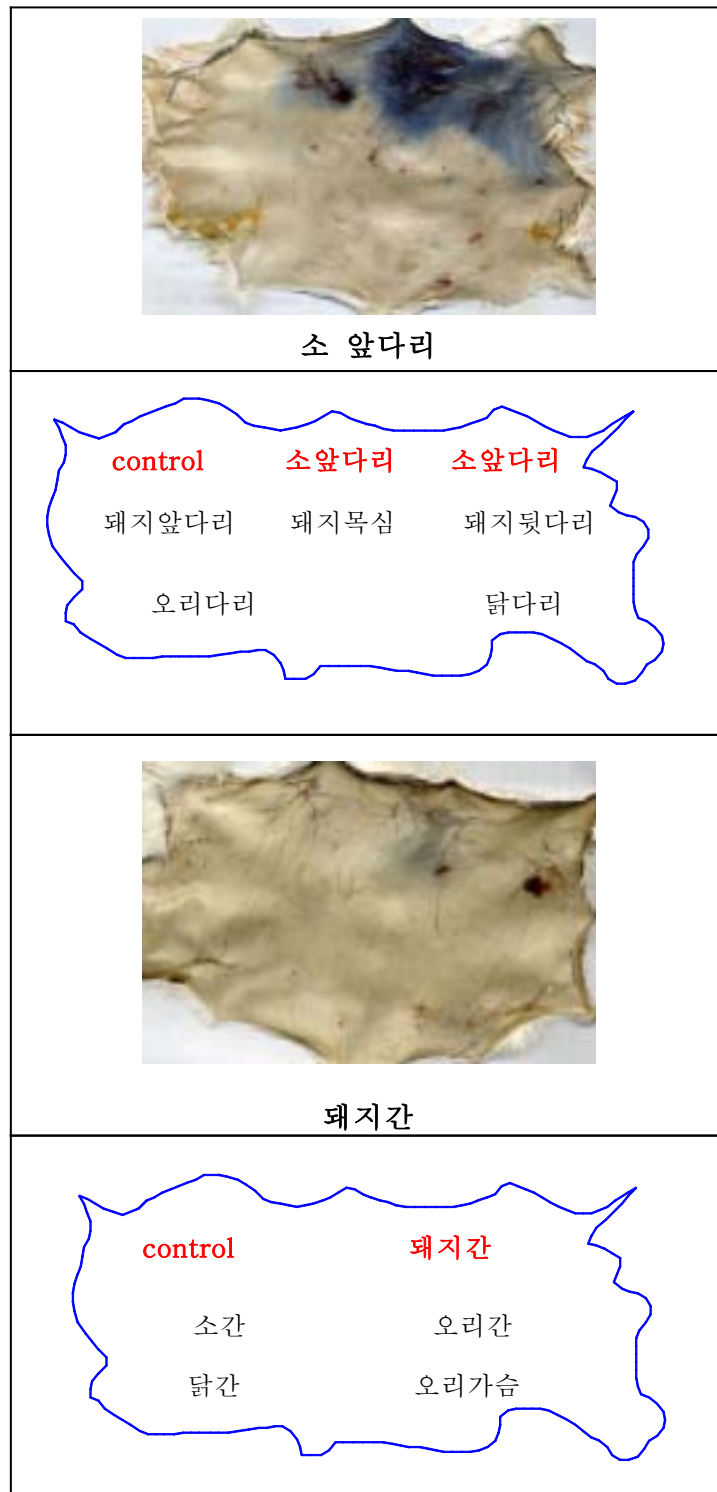


Fig 15. The skin of PCA on cross reaction between all meat(A)



Fig 16. The skin of PCA on cross reaction between all meat(B)

축종 간 상호교차 반응에서는 닭다리 외에는 다른 축종과 상호반응이 없음을 나타냈다(Fig 15와 16). 닭다리는 소 도가니살과 반응을 일으키고 있는데 이는 소도가니살과 닭다리와 유사한 단백질의 구조를 가지는 것으로 볼 수 있다.

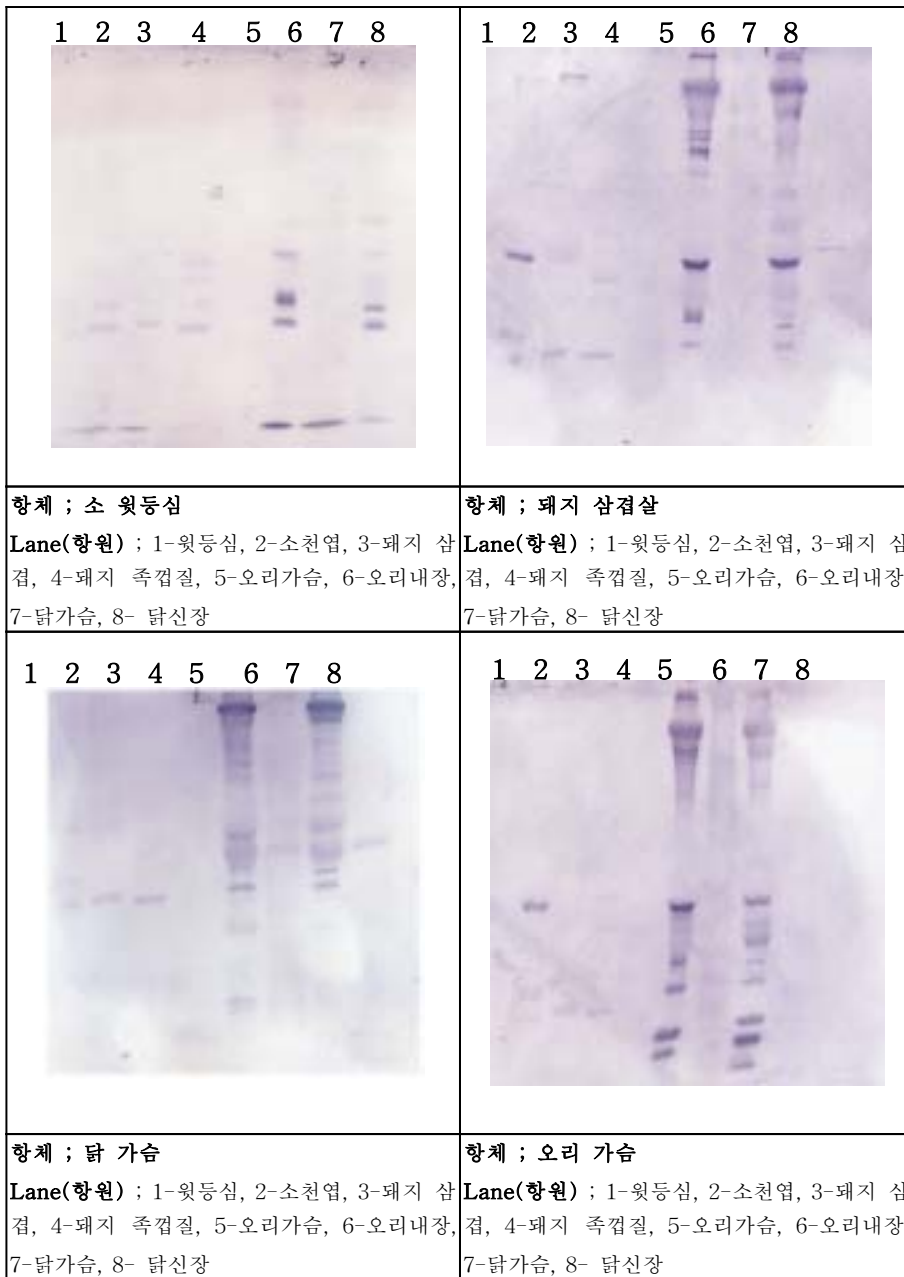


Fig 17. Change of western blotting on cross reaction between all meat

축종간 공통 항원성의 western blotting적 변화는 Fig 17에 나타나 있다. 이 결과에서 보면 소고기의 경우 소 등심에 대해 돼지 삼겹, 오리가슴, 닭가슴등과 그 반응성이 인정됨을 알 수 있다. 돼지의 경우나 닭 가슴, 오리가슴의 경우에서도 마찬가지로 결과를 보이고 있음을 알 수 있다. 이는 살부위는 살부위끼리 그 공통항원성이 인정된다고 할 수 있다. 상기 Fig15와 16의 PCA결과와는 다소 차이가 있지만 이는 방법의 차이에서 오는 것으로 사료된다.

## 2. 우유

각 유단백의 상호교차반응은 Table 7과 Fig 18에 잘 나타나 있다. 여기에서 보면 유단백들이 각각의 자기 항원-항체에서 반응이 일어났으며(PCA결과 역시) 각각의 casein과 유청에서 보면  $\alpha$ 와  $\beta$ -casein에서 서로 교차반응이 일어났으며  $\kappa$ -casein에서는 어떠한 상호교차반응도 일어나지 않았다. 유청단백질의 경우  $\alpha$ -lactoglobulin에서 역시 상호교차 반응을 일으키지 않았다. 그러나  $\beta$ -lactoglobulin에서는  $\beta$ -casein과  $\alpha$ -lactoglobulin에서 교차가 일어났다.

Table 7. The cross reaction of each milk proteins

항원	항체						
	$\alpha$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	$\alpha$ -La	$\beta$ -Lg	$\beta$ -Lg B	Lf
$\alpha$ -Casein	●	●	×	×	×	×	×
$\beta$ -Casein	●	●	×	●	×	×	×
$\kappa$ -Casein	×	×	●	×	×	×	×
$\alpha$ -Lactalbumin	×	×	×	●	×	×	×
$\beta$ -Lactoglobulin	×	●	×	●	●	●	×
$\beta$ -Lactoglobulin B	×	×	×	×	●	●	×
Lactoferrin	×	×	×	×	×	×	●

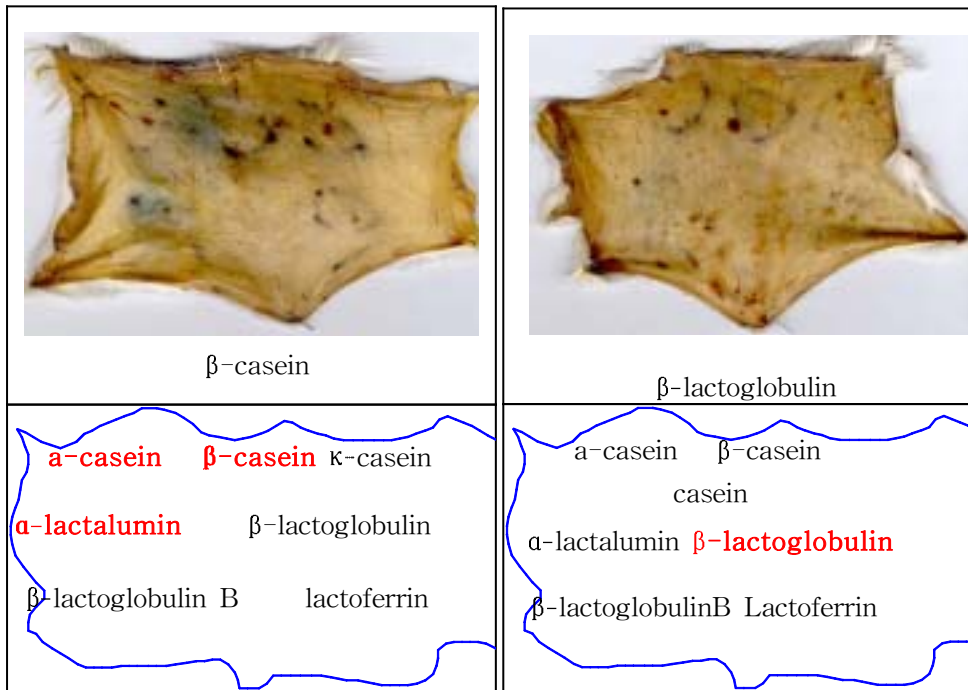


Fig 18. The skin of PCA in milk proteins

### 3. 우유와 식육간의 상호교차 반응

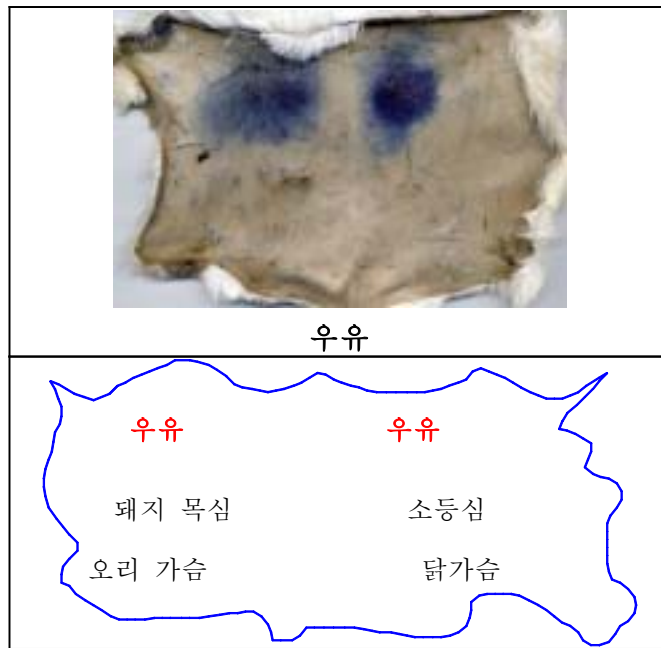


Fig 19. The cross reaction between milk and meat

식육과 우유의 공통반응성 효과는 Fig 19에 나타나 있으며 그 western blotting의 결과는 Fig 20에 나타나 있다. 우유와 식육간의 공통반응성은 존재하지 않는다는 것을 볼 수 있다.

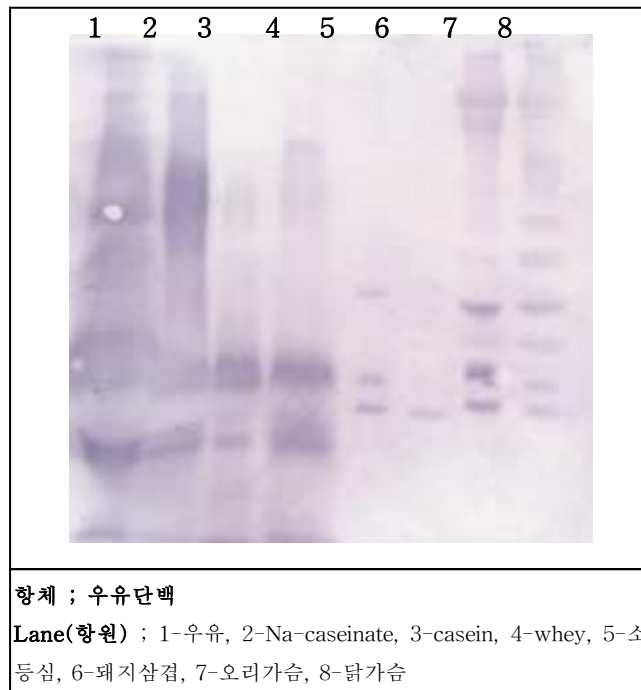


Fig 20. Change of western blotting for cross reaction between milk and meat



## 제 4 절 Allergy를 감소(hypoallergy)시키는 공정

### 1. 소 등심 저 알레르기처리 결과

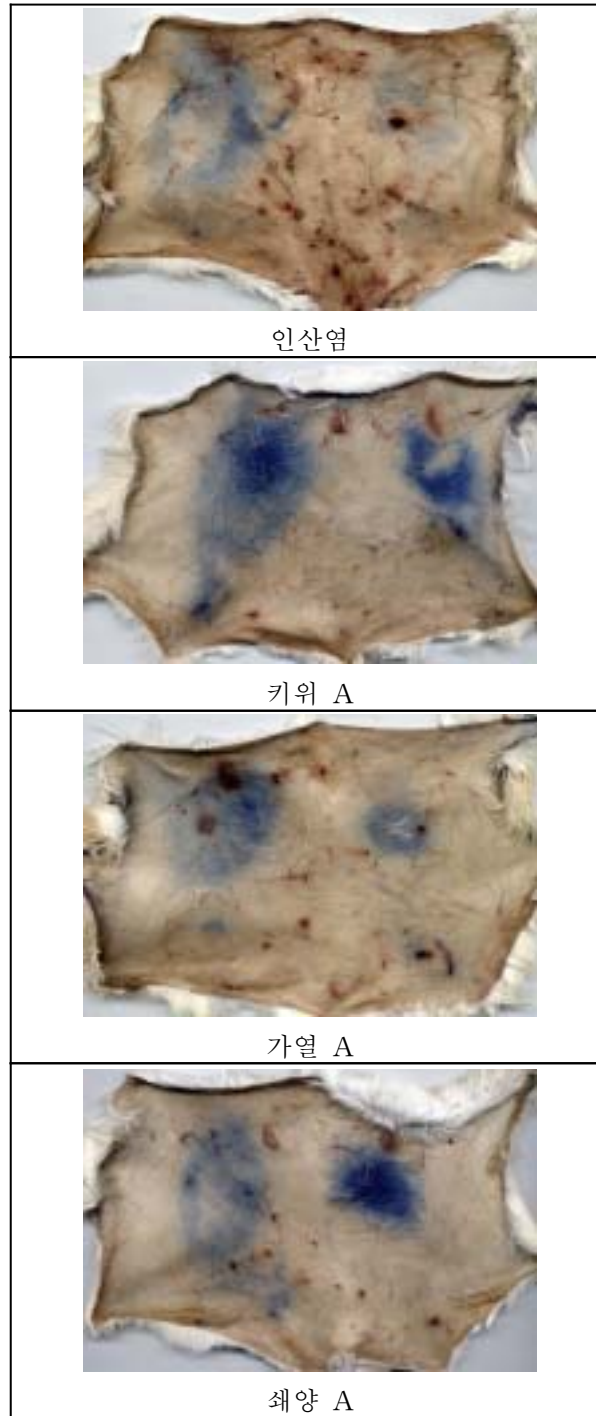


Fig 21. The skin of PCA for hypoallergy treatment in beef I

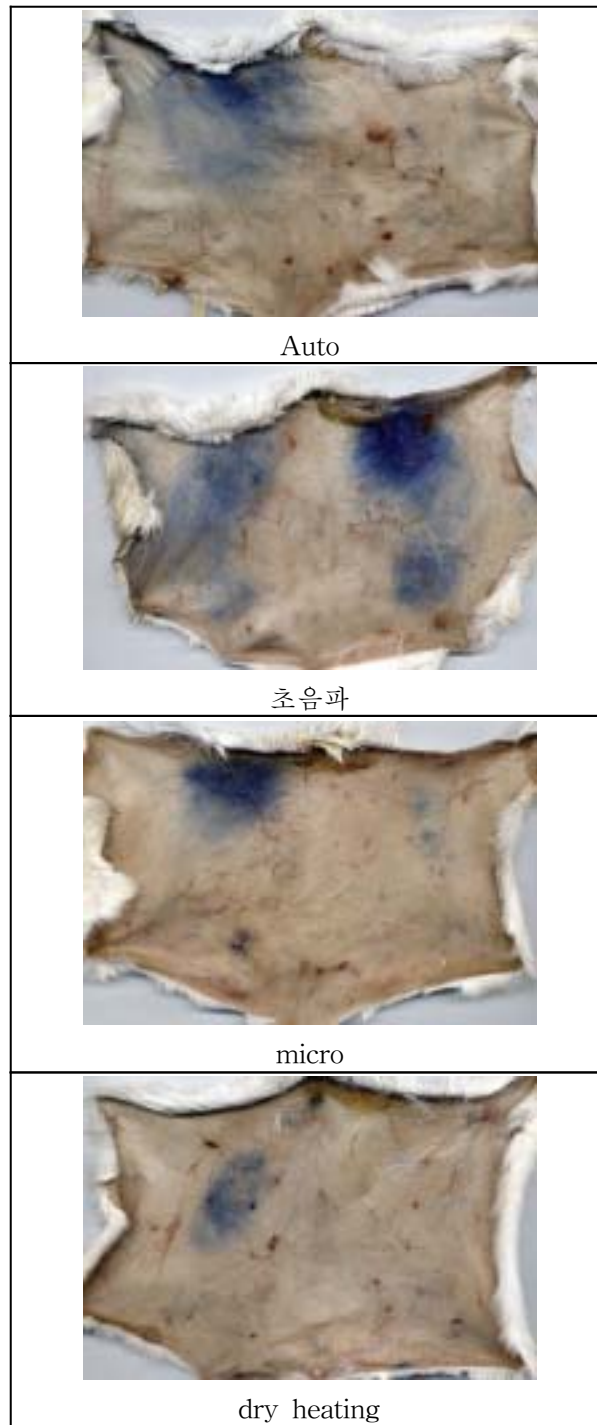


Fig 22. The skin of PCA for hypoallergy treatment in beef II

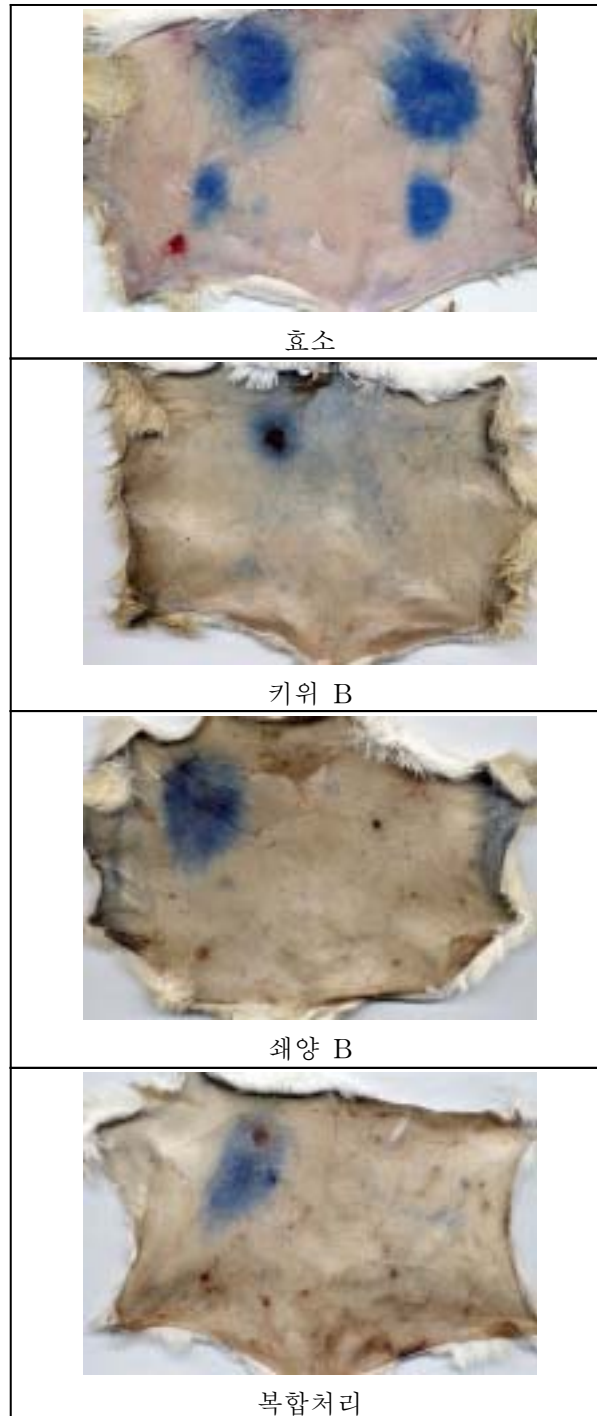


Fig 23. The skin of PCA for hypoallergy treatment in beef III

Fig 21-23은 소등심을 저알레르기 처리를 한 PCA 결과이다. 여기에서 보면 저 allergy 처리에서 allergy가 완전히 억제되는 것은 가열처리를 한 것으로 쇠양 B(추출액+가열 3분), autoclave 처리, micro파 처리, dry heating처리, 복합처리를 했을 때이다. 또한 천연효소(키위)를 침지한 후 tolergen과 같이 3분간 가열

했을 때 allergy가 억제되는 것으로 나타났다. 즉 가열처리로 인한 단백질 구조 변성으로 이러한 결과를 보인 것으로 보인다. 인산염의 경우도 어느정도 억제가 되는 것으로 보이고 있다. 나머지 처리들은 거의 효과를 보이고 있지 않다. 천연효소와 tolergen(쇄양)을 그냥 처리했을때에는 allergy 억제효과는 없는 것으로 나타났다. Katayama법으로 측정된 allergy 억제율은 Table 8에 나타나 있다.

2. 돼지목심 저 알레르기 처리 결과(PCA)

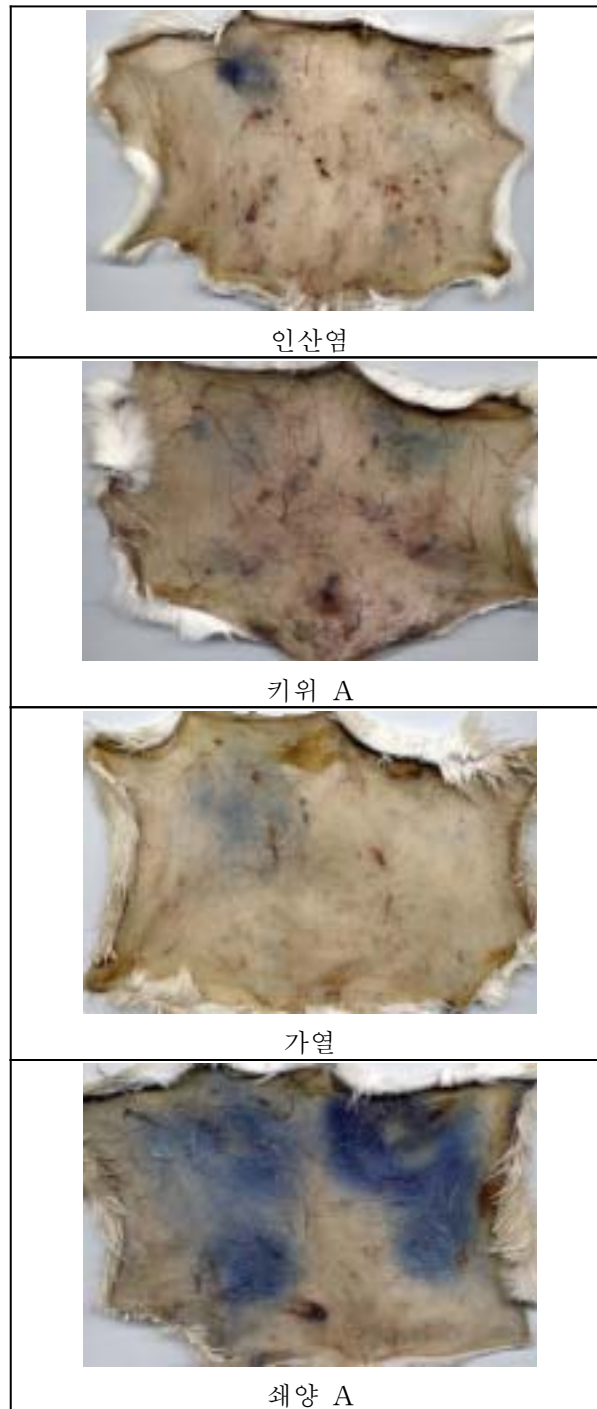


Fig 24. The skin of PCA for hypoallergy treatment in pork I

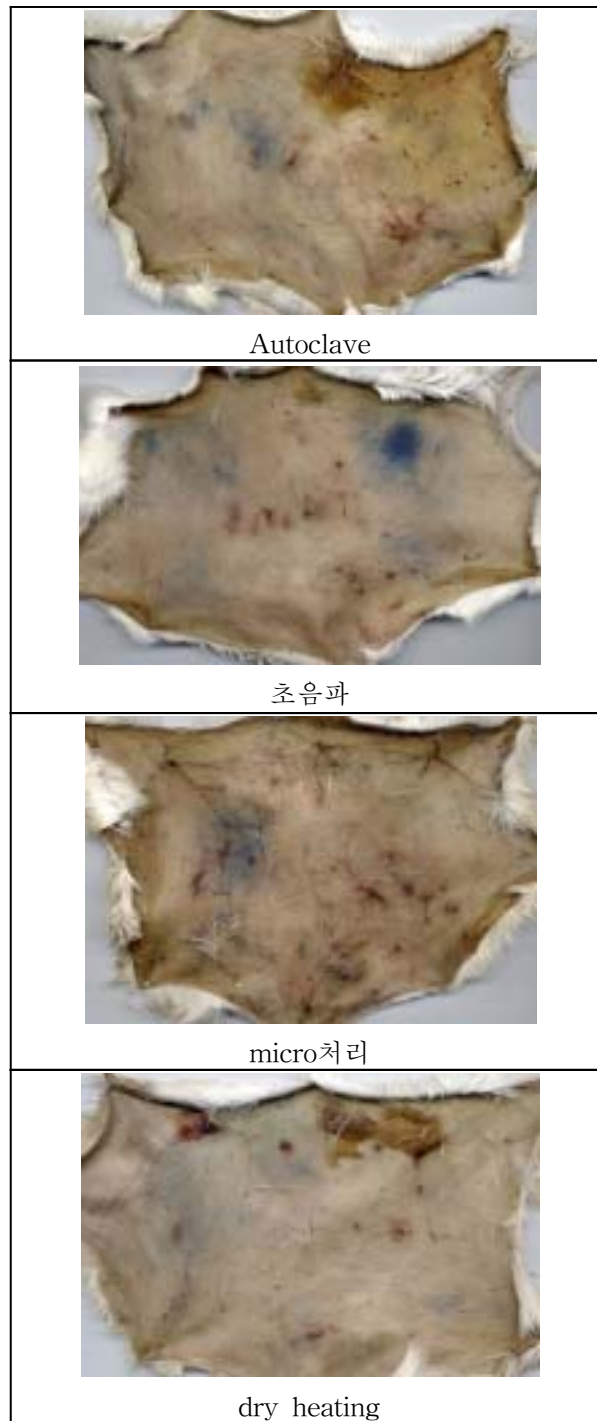


Fig 25. The skin of PCA for hypoallergy treatment in pork II

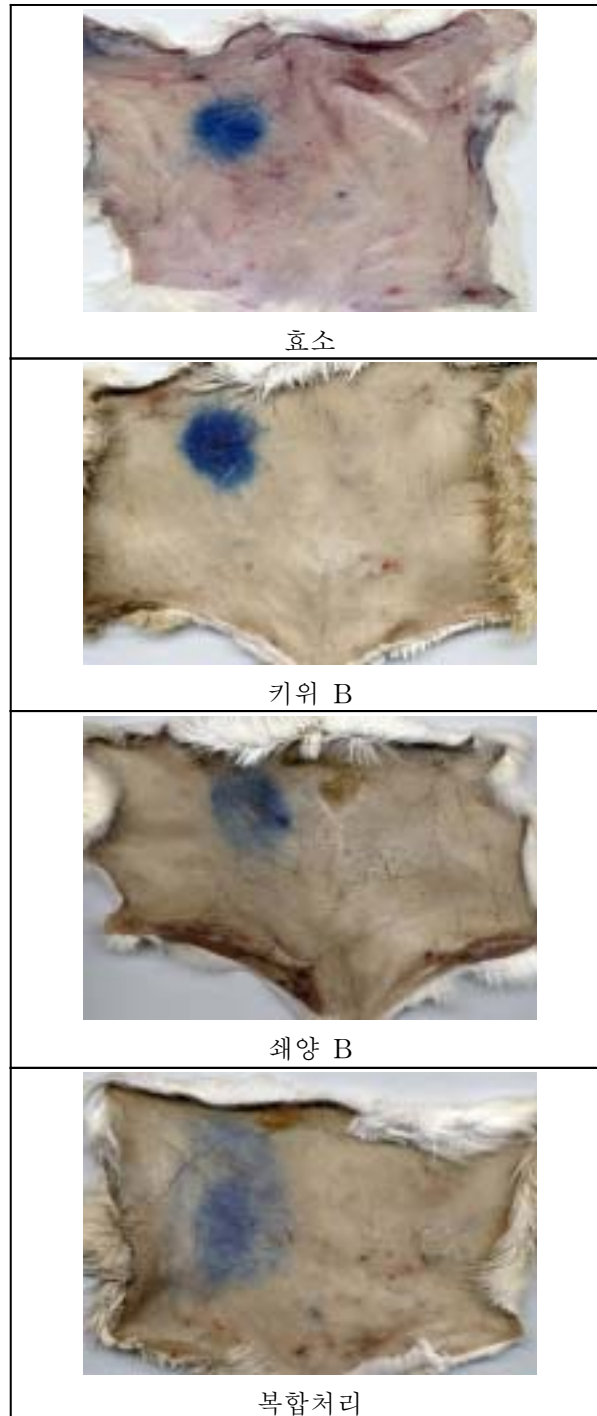


Fig 26. The skin of PCA for hypoallergy treatment in pork III

돼지고기에 있어 저 알레르기 처리 공정은 Fig 24-26에 나타나 있다. 이것도 역시 소고기와 마찬가지로 가열처리로 감소됨을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 천연효소와 켈양(tolergen)도 역시 그 침지액과 켈양 추출물

만 했을 때에는 억제를 시키지 못하지만 이것을 짧은 시간 가열하면 억제가 일어나는 것을 볼 수 있다. 또한 인산염도 마찬가지로의 결과를 보이고 있다. 이 또한 Katayama법으로 그 억제율을 보면 Table 8에 나타나 있다. 이것은 후에 설명하기로 한다.



3. 닭가슴 저 알레르기 처리 결과

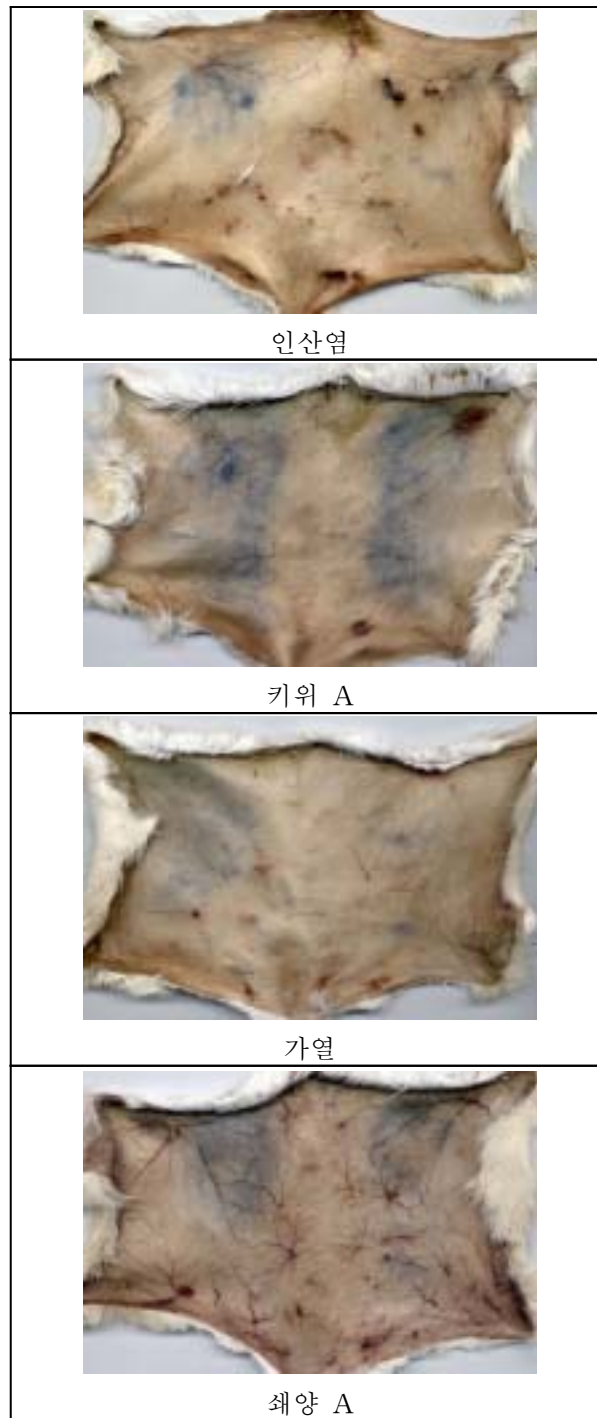


Fig 27. The skin of PCA for hypoallergy treatment in chicken I

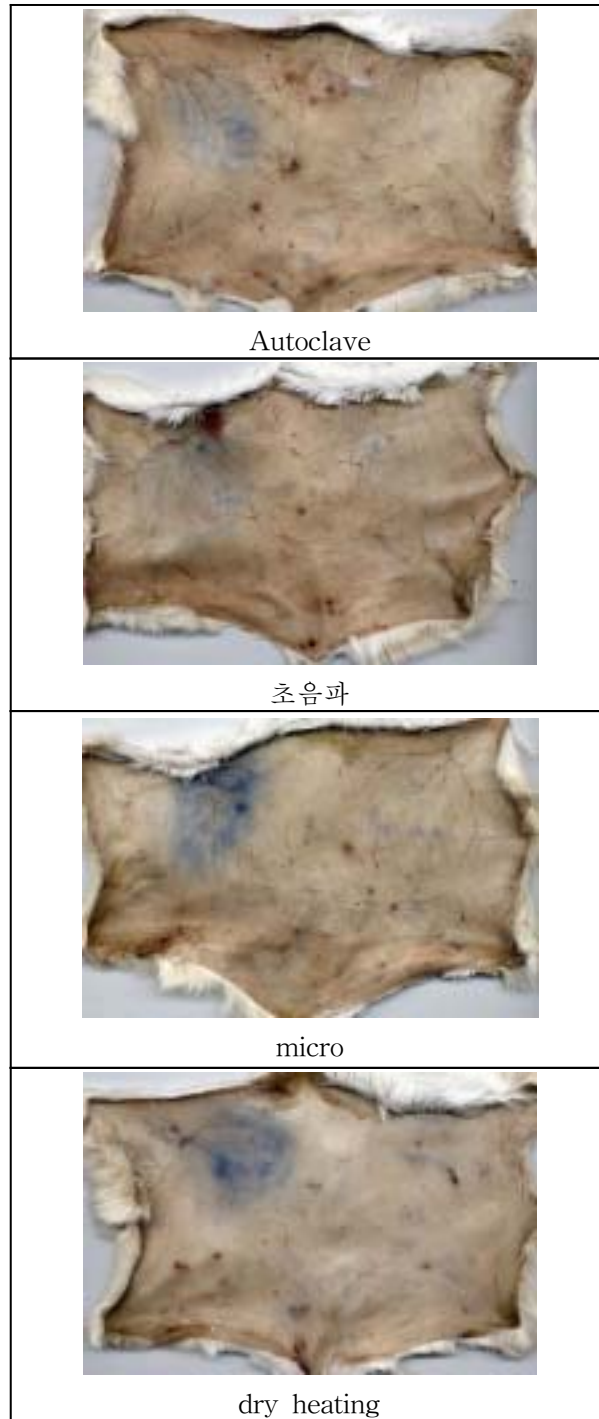


Fig 28. The skin of PCA for hypoallergy treatment in chicken II

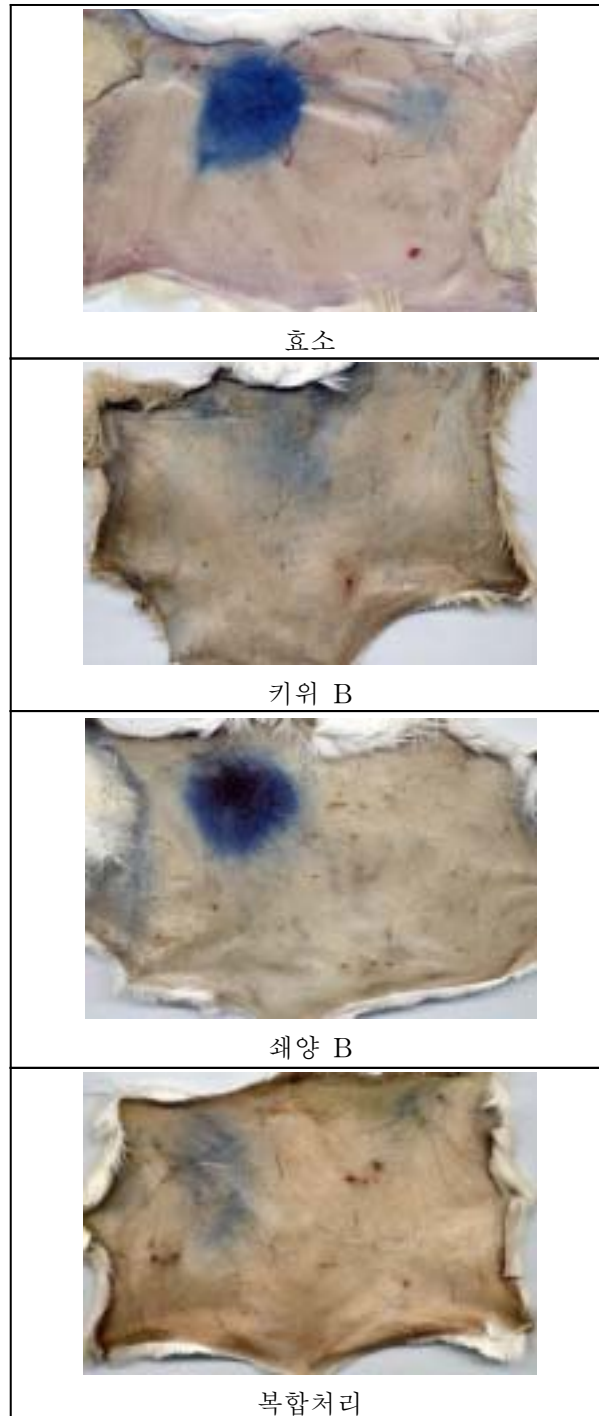


Fig 29. The skin of PCA for hypoallergy treatment in chicken III

닭의 저 allergy 처리 PCA 결과는 Fig 27-29에 나타나 있다. 닭가슴을 가열 처리를 하면 그 억제가 증가하는 것을 볼 수 있다. 이것은 상기의 소고기나, 돼지고기의 경우에서와 마찬가지로 결과를 보이고 있다. 그 억제율 %는 Table 8에 나타나 있다.

4. 오리가슴 저 알레르기 처리 결과

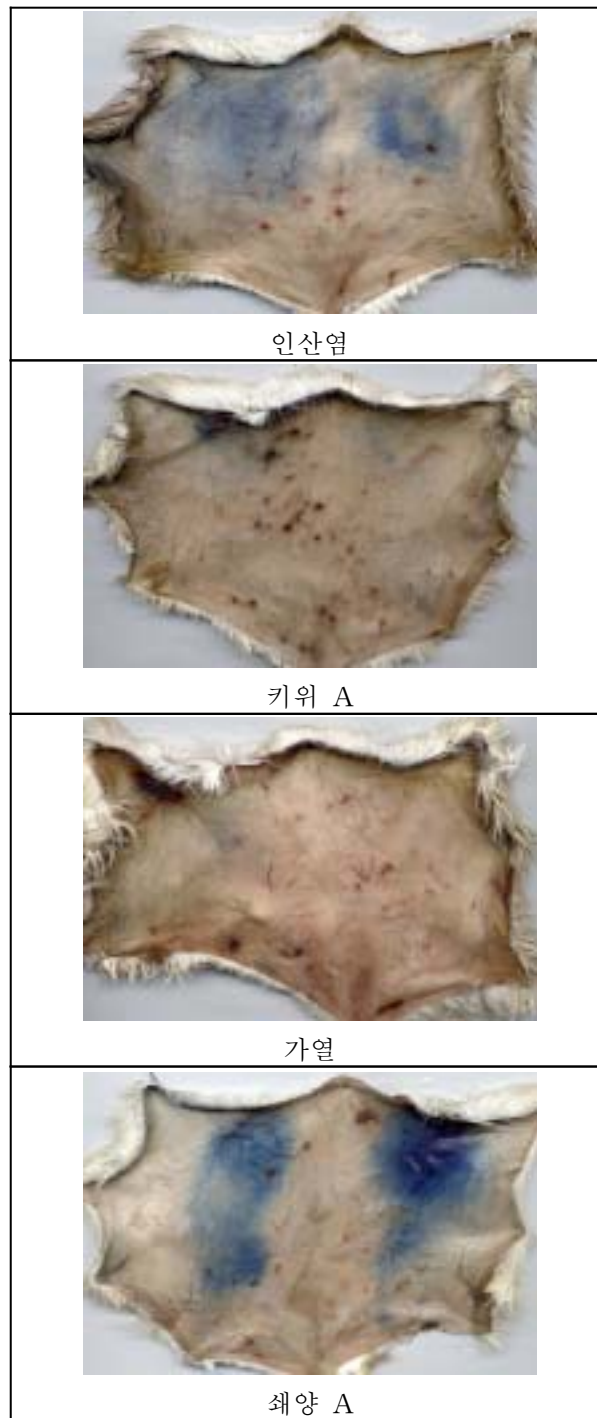


Fig 30. The skin of PCA for hypoallergy treatment in duck I

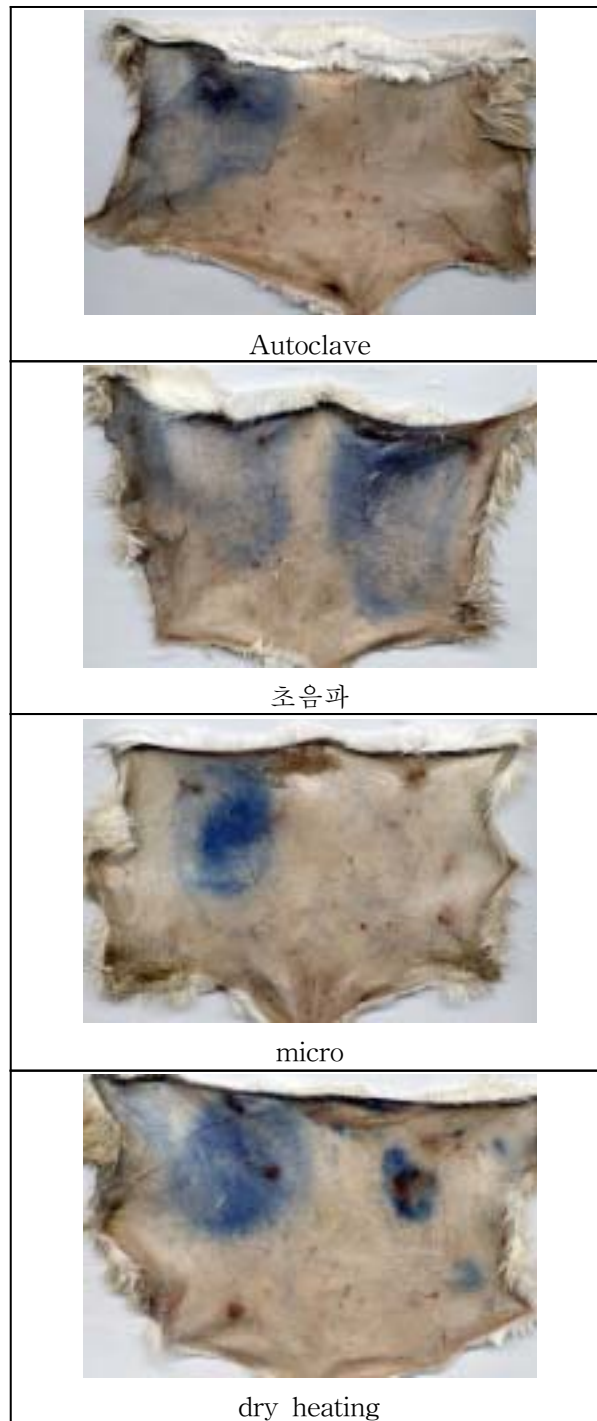


Fig 31. The skin of PCA for hypoallergy treatment in duck II

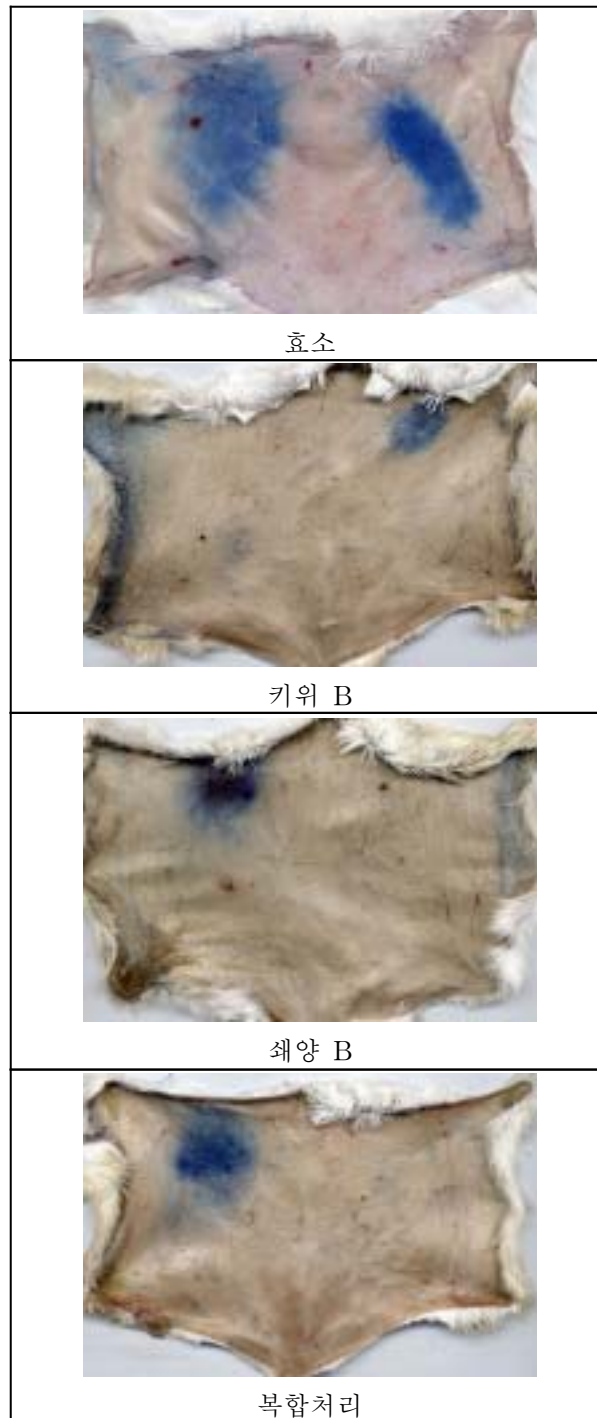


Fig 32. The skin of PCA for hypoallergy treatment in duck III

오리의 저 allergy처리에 따른 PCA 결과는 Fig 30-32에 나타나 있다. 오리의 경우도 역시 마찬가지로 다른 축종과 같은 결과를 보이고 있다. 즉 가열처리하였을 때 그 억제가 크다는 것을 알 수 있다.

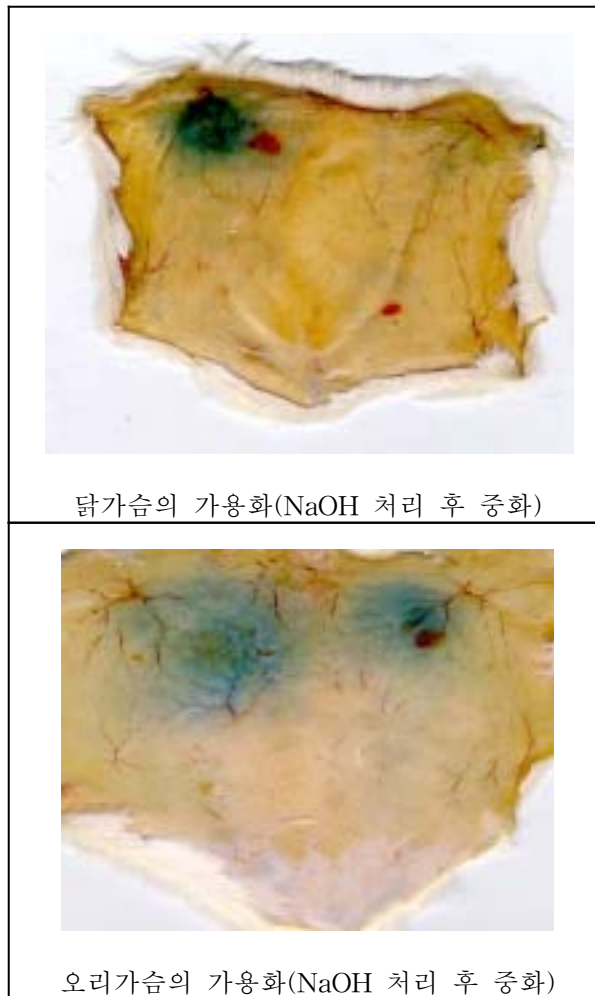


Fig 33. The skin of PCA for hypoallergy treatment(solubilization by NaOH)

Fig 33은 가용화 처리로 저 allergy처리를 한 것이다. 여기에서 보면 그냥 가용화만 시켜도 allergy가 억제됨을 볼 수 있다. NaOH로 가용화시킨 후 다시 중화시킨 것이다.

5. 알레르기를 감소시키는 공정에 대한 western blotting의 관찰

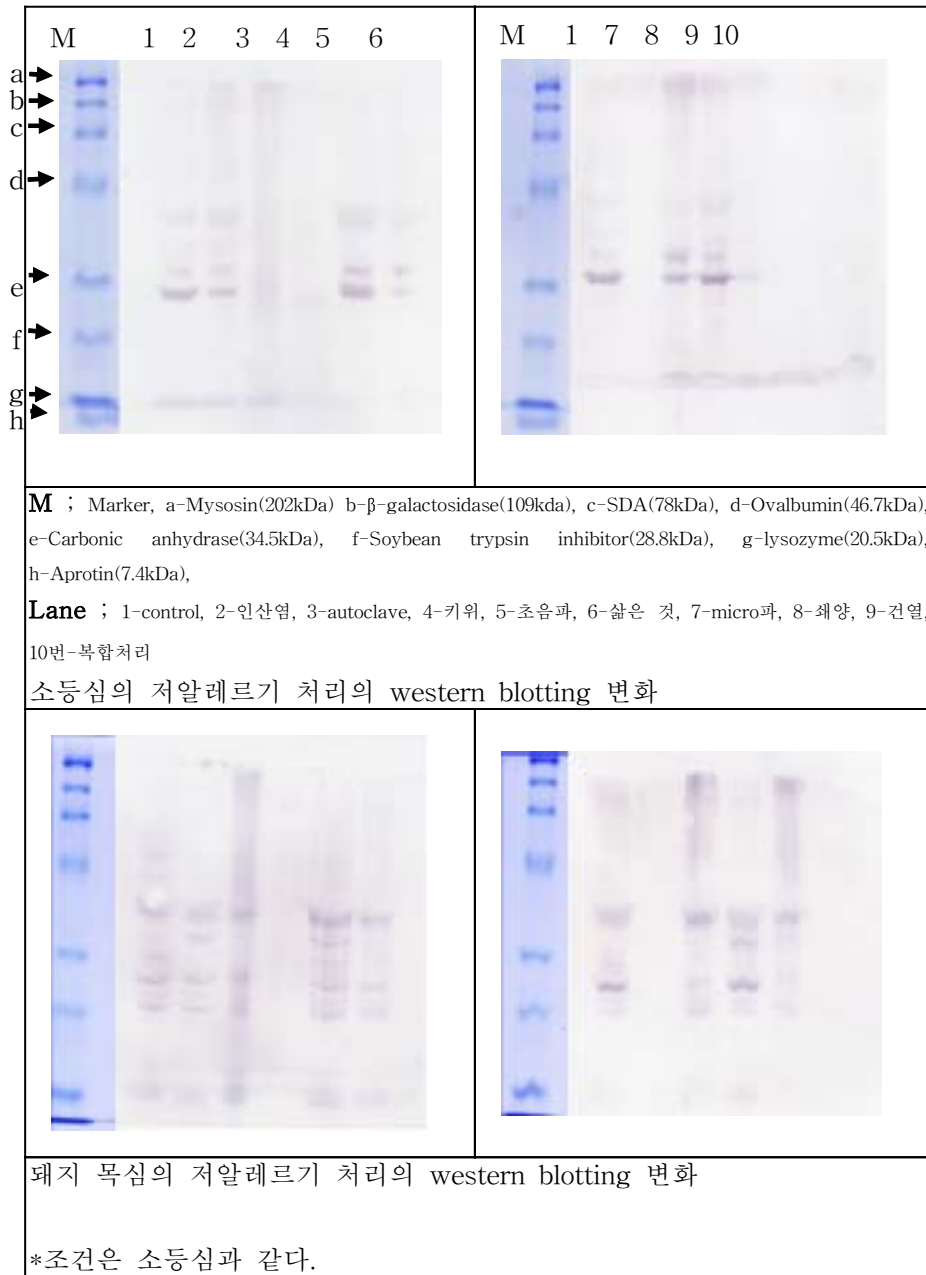


Fig 34. Change of western blotting for hypoallergic treatment in beef and pork

위에서 처리한 모든 저 allergy 처리에 대한 western blotting의 변화는 Fig 34에 나타나 있다. 이는 PCA 결과와 마찬가지로 가열처리를 했을 때 감소되는 것처럼 control과 비교시 band가 소멸되었거나 약한 것을 확인할 수 있다. 이는 소고기나 돼지고기의 경우에서 다 마찬가지로 결과를 나타내고 있음을 알 수 있다.



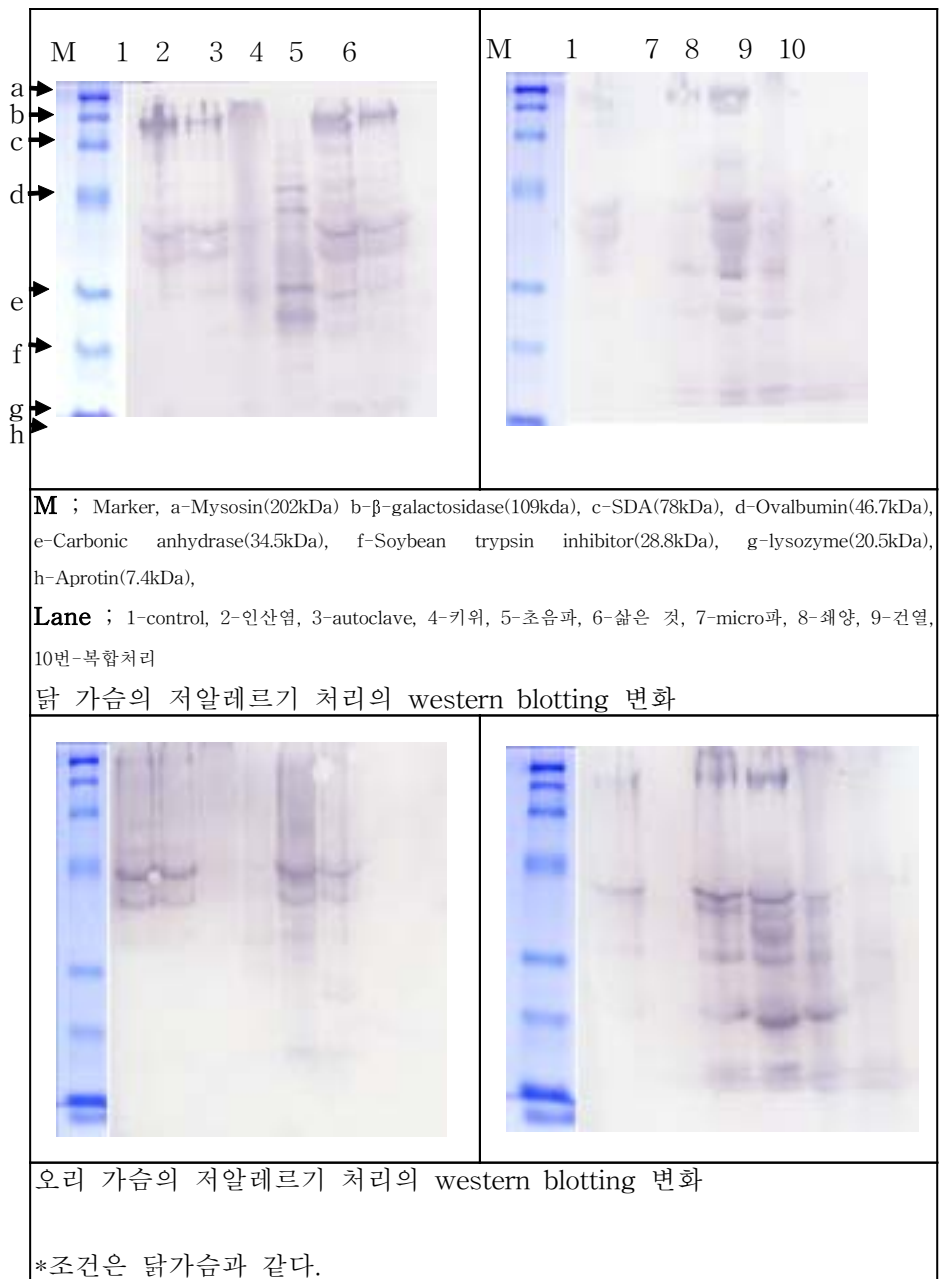


Fig 35. Change of western blotting for hypoallergic treatment in chicken and duck

Fig 35는 닭고기와 오리고기의 저 allergy 처리의 결과이다. 여기에서 보면 역시 마찬가지로의 결과를 보이고 있다. Fig 34와 같이 소고기와 돼지고기의 western blotting에서처럼 가열처리를 했을 때 allergy가 감소함을 볼 수 있다. 이또한 PCA결과와 같다고 할 수 있다.

6. 우유 저 알레르기 처리 결과

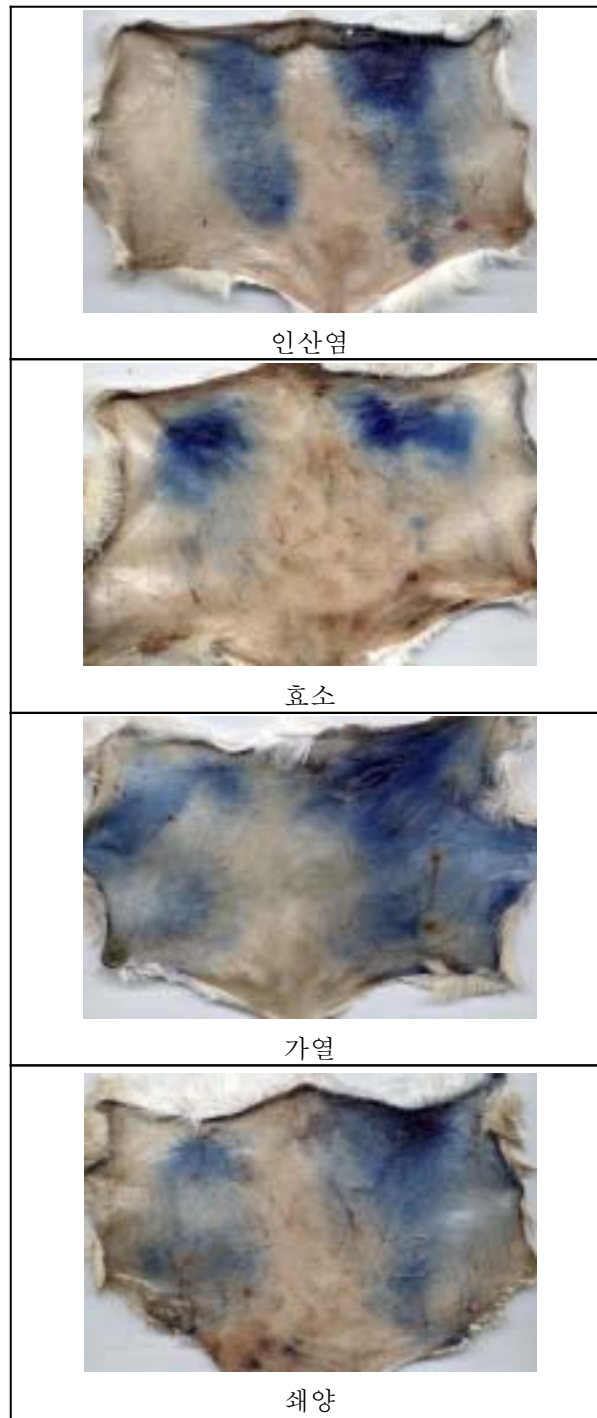


Fig 36. The skin of PCA for hypoallergic treatment in milk I

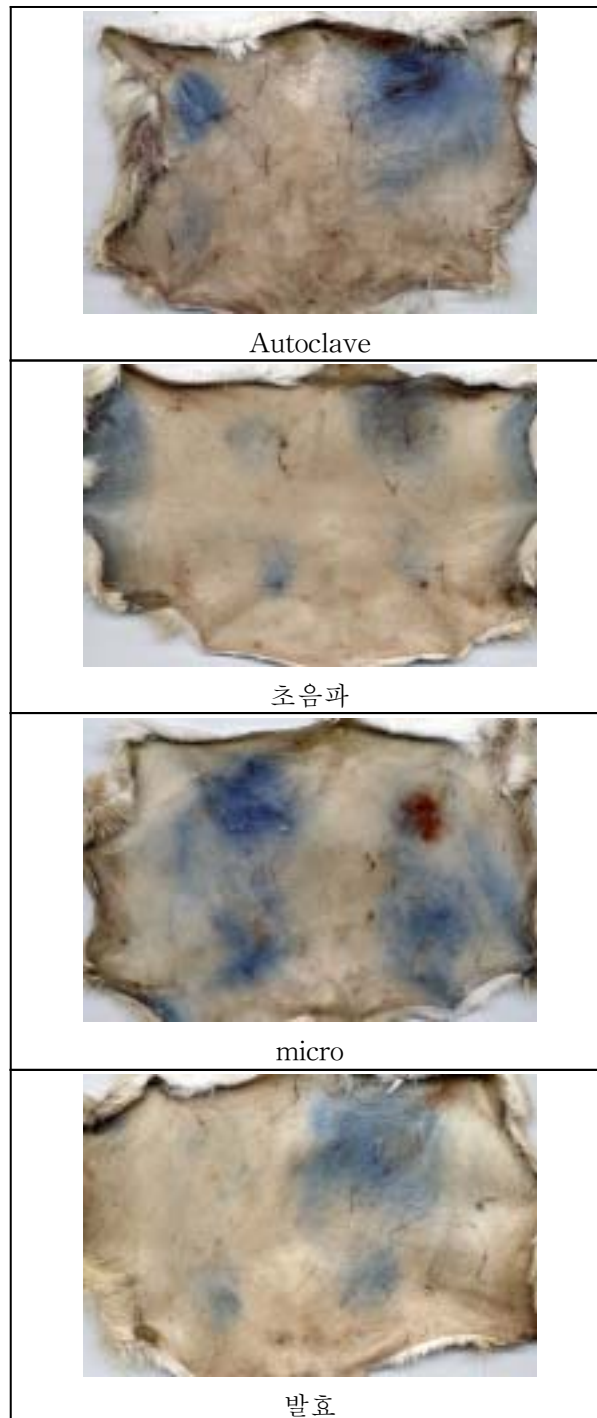


Fig 37. The skin of PCA for hypoallergic treatment in milk II

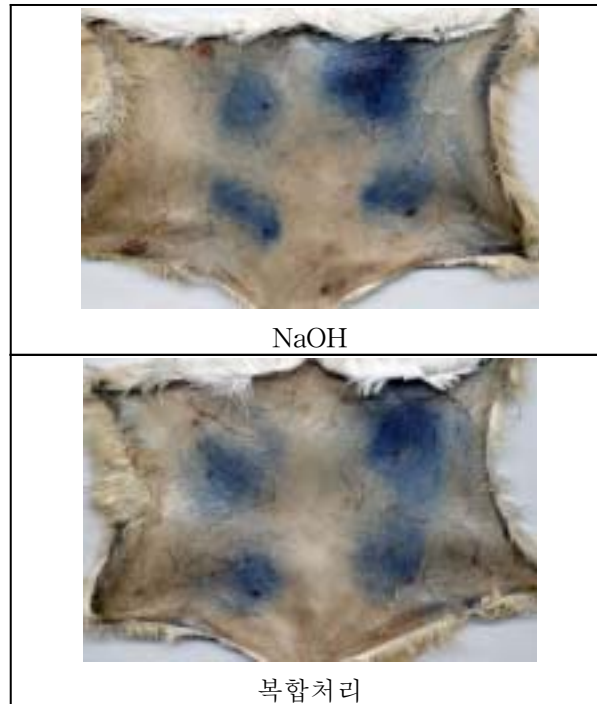


Fig 38. The skin of PCA for hypoallergic treatment in milk III

우유의 저 allergy 처리결과는 Fig 36-38에 나타나 있다. 저 allergy 처리에 있어 억제시키는 처리로는 효소, autoclave, micro 파, NaOH 처리, 복합처리이다. 이 처리를 했을 때의 control과 비교시 감소정도 %는 Table 8에 나타나 있다.

7. Katayama법으로 알레르기 감소율 확인

Table 8. The ration of inhibition by Katayama method of PCA skin

	돼지목심	닭가슴	소등심	오리가슴	우유
인산염	59.07	44.21	43.22	52.91	0
Autoclaving	73.34	29.99	91.95	63.54	45.00
키위 A	0.56	0	0	7.28	-
초음파	0	0	5.03	0	0
Boiling 5분	43.55	32.69	16.09	0	0
microwave	30.18	27.01	79.76	95.82	99.28
쇄양 A	0	0	0	0	0
dry heating	5.0	7.90	91.76	39.59	-
효소	92.48	98.01	0	0	28.77
키위 B	93.48	0	90.16	12.96	-
쇄양 B	64.04	86.37	80.40	76.15	-
NaOH	99.02	38.63	26.75	85.81	84.50
복합처리	41.16	65.56	67.91	85.67	96.90

이 Table 8은 각 저 allergy 처리된 고기에 대한 Katayama inhibition percent를 나타낸 것이다. 식육에서는 상당한 가열처리를 통하여 알레르기를 감소시킬 수 있는 것을 볼 수 있으며 또한 인산염, 가용화(NaOH처리)도 저 알레르기 효과가 있음을 알 수 있다. 키위, 쇠양 단독 처리 시 저 알레르기 효과가 없지만 약간의 가열을 통하여 알레르기가 감소됨을 알 수 있다. 우유는 효소나 autoclave 처리만이 저 allergy 효과가 각각 28%, 45%로 적게 나타났다. 모든 복합처리의 경우에는 그 억제율이 41-96%로 높은 효과가 있음을 알 수 있다.

8. 소등심 복합처리 단계 별 알레르기 감소율

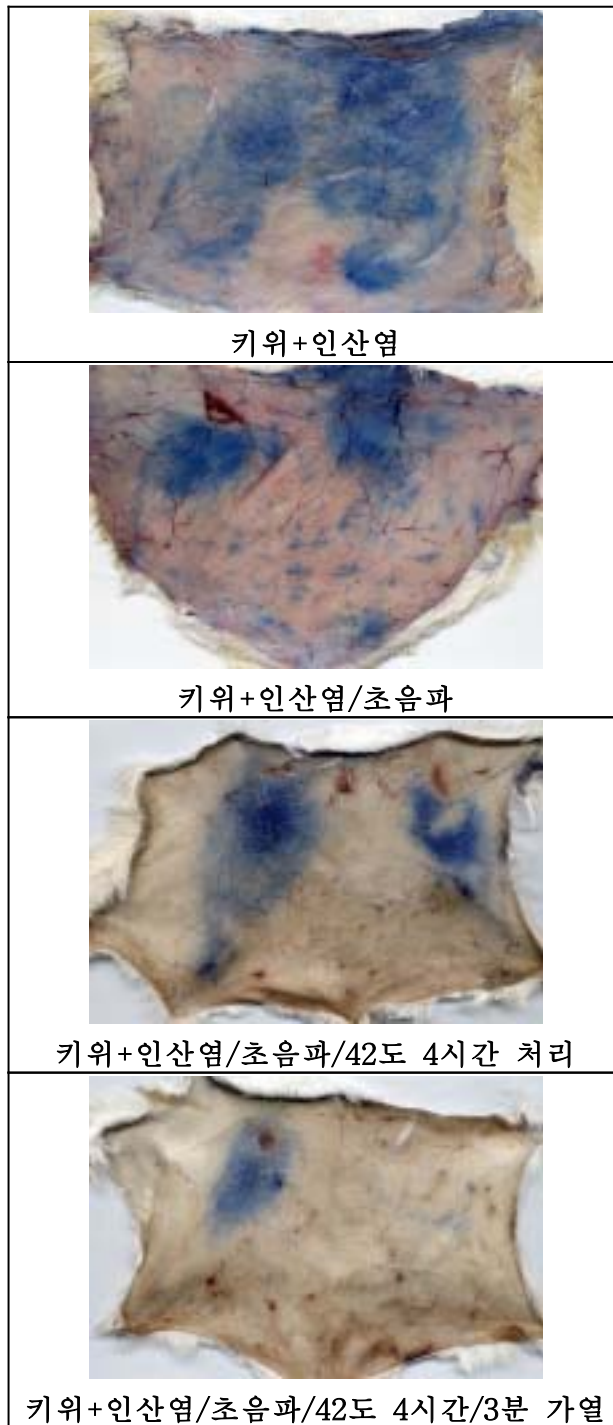


Fig 39. The skin of PCA for hypoallergic treatment by each step in meat

Fig 39와 Table 9에서는 고기를 단계별 복합처리로 저 allergy 처리를 한 PCA skin과 억제율이다. 결과에서 보듯이 단계별로 억제가 안되는 것부터 억제되는

처리를 복합적으로 처리한 것으로 천연효소(키위)에 인산염이 첨가된 PCA에서 allergy를 억제하는 못함을 볼 수 있다(Fig 39). 또한 억제율도 억제를 하지 못한 것으로 나타났다(Table 9). 그다음 여기에 다시 초음파처리를 했다. 역시 억제하지 못하고 억제율도 나타나지 못했다. 그러나 여기에 효소활성을 위해 42℃에서 4시간 처리를 더하면 약간 allergy가 감소(Fig 39)되는 것을 볼 수 있고 그 억제율도 10%(Table 9)로 나타남을 볼 수 있다. 여기에 다시 다음 단계로 3분 끓여 본 결과 그 억제효과는 더 증가된 것을 볼 수 있다. 그리고 그 억제율도 68%로 나타났다. 이는 단일처리시 전혀 억제를 못하는 처리를 단계별로 한 단계씩 더해가면 allergy 억제효과가 나타난다고 할 수 있겠다.

Table 9. The ration of inhibition by Katayama method for hypoallergic treatment by each step in PCA skin

처리 단계	알레르기 감소율
1단계	0
2단계	0
3단계	10.8
4단계	67.91

9. 인삼염, 키위처리 후 SEM 관찰결과

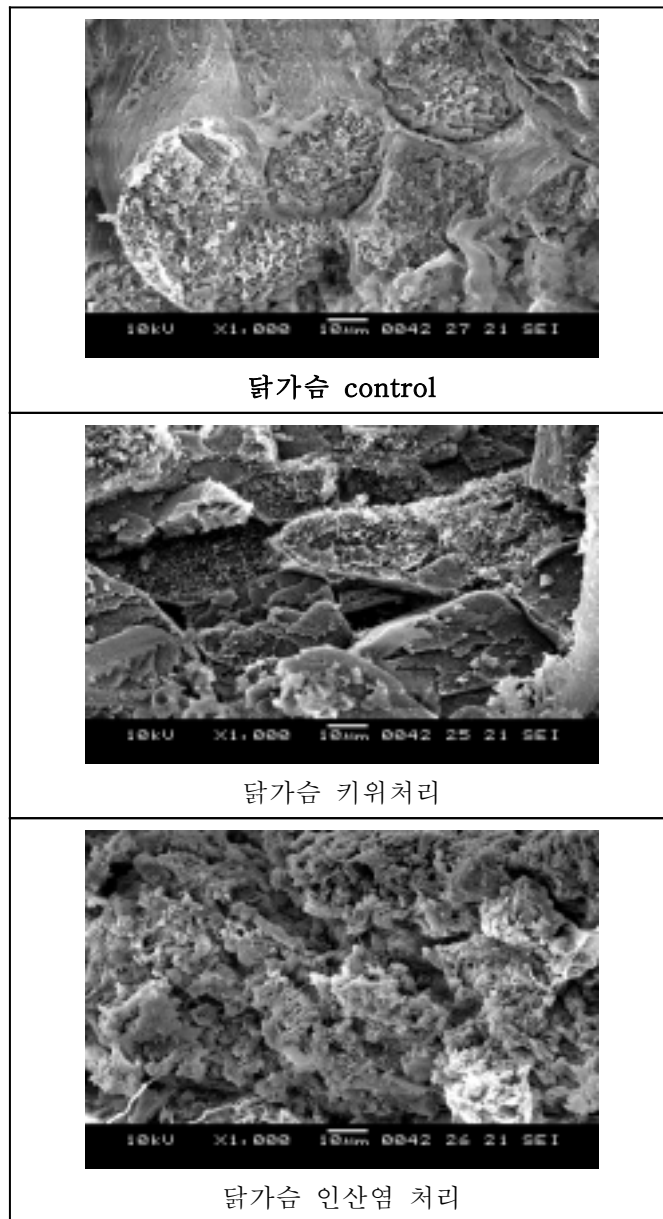


Fig 40. Observation of SEM for hypoallergic treatment in meat

고기의 저 allergy 처리 즉 천연효소(키위)처리와 인삼염 처리의 전자현미경 SEM의 결과는 Fig 40에 나타나 있다. 이는 control과 비교시 조직이 두가지 처리 모두 분산됨을 볼 수 있다. 이것은 근육의 구조가 풀려 단백질의 구조를 바꿀수 있음을 나타내 주고 있다.



## 제 5 절 잔여 allergy 평가

잔여 allergy는 저 allergy 처리를 거친 항원을 다시 면역을 시켜 얻은 혈청을 가지고 그 잔여 알레르기 평가를 실시하였다. Fig 41은 그 항원에 대한 PCA 결과이다. 여기서 저 allergy 처리는 복합처리이다. 결과는 잔여 allergy가 존재한다는 것을 볼 수 있다. 그렇지만 이 결과는 새로운 알러젠이 생성되었거나 처음 저 allergy 처리시 100%가 억제되지 않았기 때문에 allergy 억제되었다 볼 수 있다.



Fig 41. The skin of PCA after hypoallergic treatment in meat and milk

## 제 6 절 알레르기를 억제하는 인자의 조제

### 1. 한약재에서 Tolergen의 제조

Table 10은 allergy를 억제하는 tolergen의 추출을 어떤 용매로 추출하였을 때 가장 많이 추출되는가를 보기 위한 것이다. 이 결과에서 보듯이 물에서 그 추출물이 현저히 많이 추출되는 것을 볼 수 있으며 그다음이 methanol이다. 그렇지만 다른 용매 특히 butanol에서는 그 추출량이 물이나 methanol에 비해 현저히 적게 추출되는 것을 볼 수 있다. 이는 침지시 butanol의 휘발성이 다른 것들보다 높아 잘 추출이 안되었을 것이라 본다.

Table 10. The extract fraction % of tolergen(chinese herb)

한약이름	부동한 용매에 따른 한약성분 추출율(%)			
	acetone	butanol	metanol	물
고삼	2.94	1.19	7.40	16.22
구기자	0.35	0.25	3.63	9.68
두충	2.24	1.59	8.89	16.85
법과고지	10.85	6.03	19.16	20.14
부자	0.60	0.29	4.96	18.90
산수유	<b>1.40</b>	1.94	<b>25.56</b>	23.65
	<b>1.68</b>		<b>28.78</b>	
쇄양	0.49	0.60	4.29	4.31
여정심	2.98	2.52	6.62	8.48
오매	2.28	2.27	10.06	24.27
백출	2.03	1.67	10.01	14.62
임지인	0.24	0.26	1.71	3.05
조구등	0.79	0.74	2.58	5.66
지골피	0.63	0.46	6.27	20.97
지모	1.06	0.82	12.12	29.78
측백	4.25	1.94	9.64	13.88
하고초	0.70	0.62	1.90	8.31
포공령	1.27	1.31	3.12	4.72

## 2. Slicagel chromatography

Fig 42는 각 용매에 추출된 tolergen들을 gel chromatography를 통해 그 색소를 제거하여 정제하려고 한 것이다. slicagel이 충전된 column에 이동상을 methanol로 하여 tolergen을 column을 통과시키면 그림에서 보듯이 색깔이 윗부분에서보다 아랫부분에서 연해짐을 볼 수 있다. 이는 tolergen들이 column을 통과하면서 silica gel이 그 색소를 흡착하여 tolergen만 통과하는 것이다. 이렇게 하여 tolergen을 정제하였다.

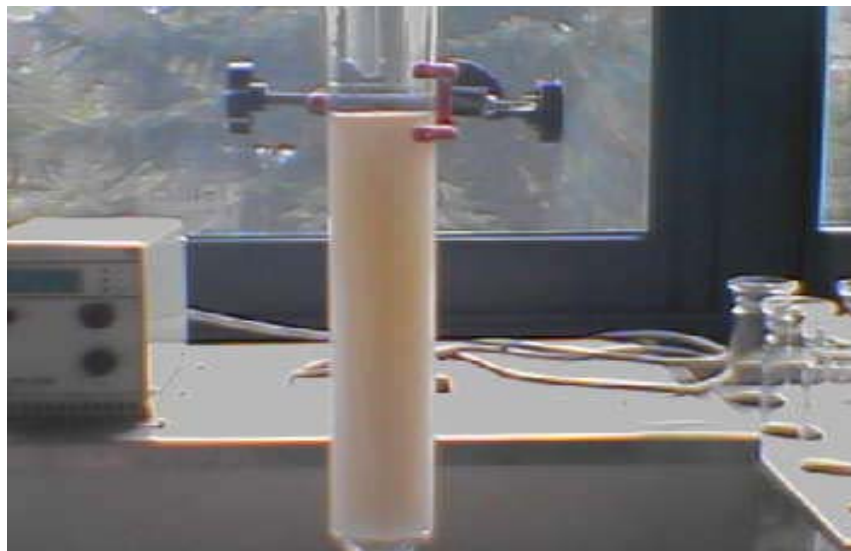
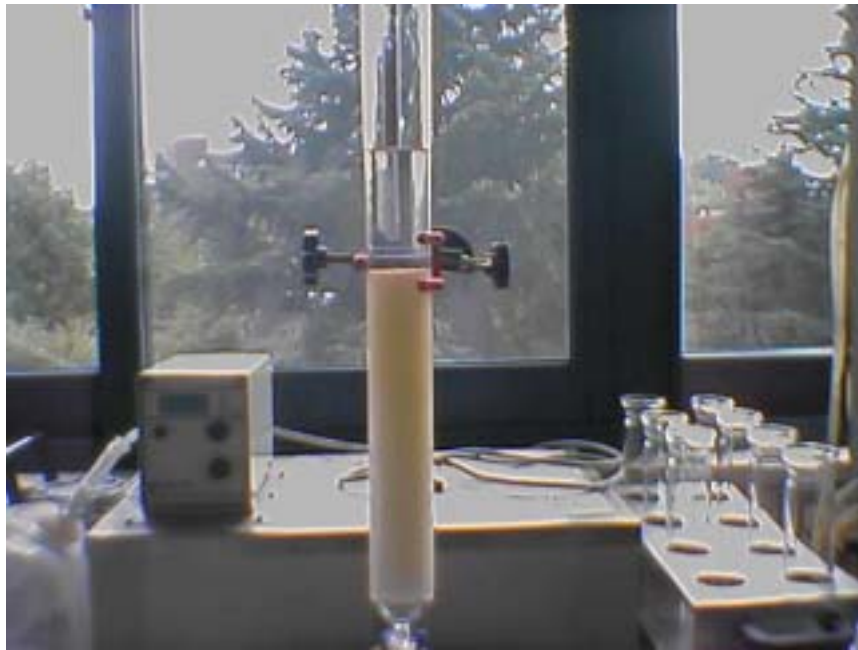


Fig 42. Gel chromatography of extract fraction for tolergen

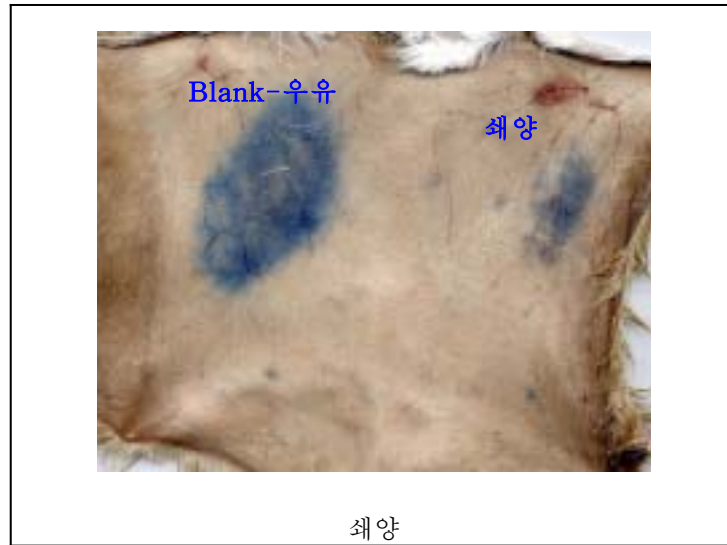


Fig 43. The skin of PCA after injection of tolergen to abdominal of guinea pig.

Fig 43은 Fig 42에서 조정제된 tolergen을 PCA한 결과이다. 결과에서 보듯이 tolergen을 항체를 주입한 후 2시간 후에 복강에 주입시키면 allergy가 감소되는 것으로 나타났다. 이는 allergy를 억제하는 tolergen(인자)이라 할 수 있다.

## 제 7 절 시판 조제분유 분석

### 1) 조제분유에 따른 PCA 결과

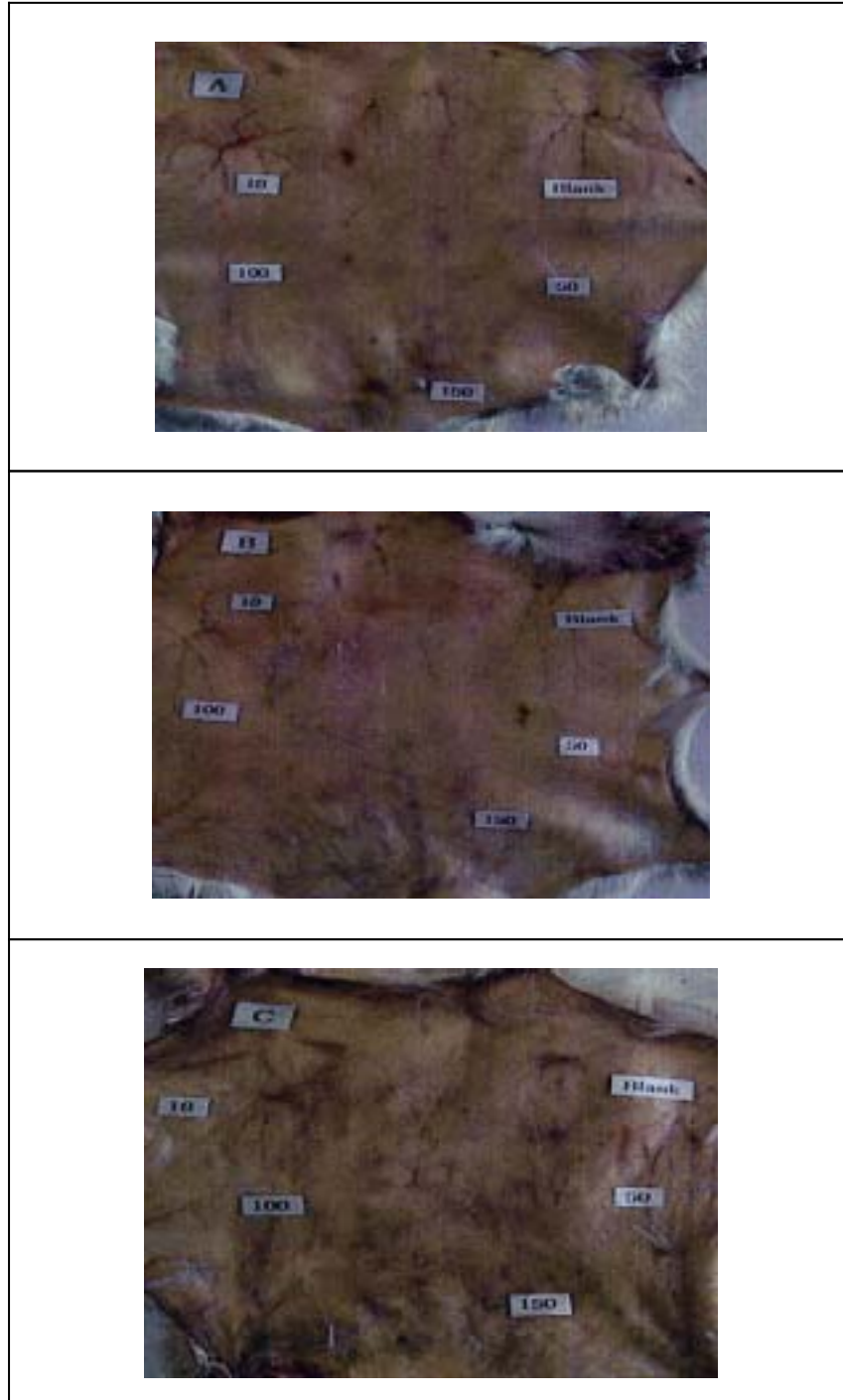


Fig 44. The skin of PCA in infant formulas A-C

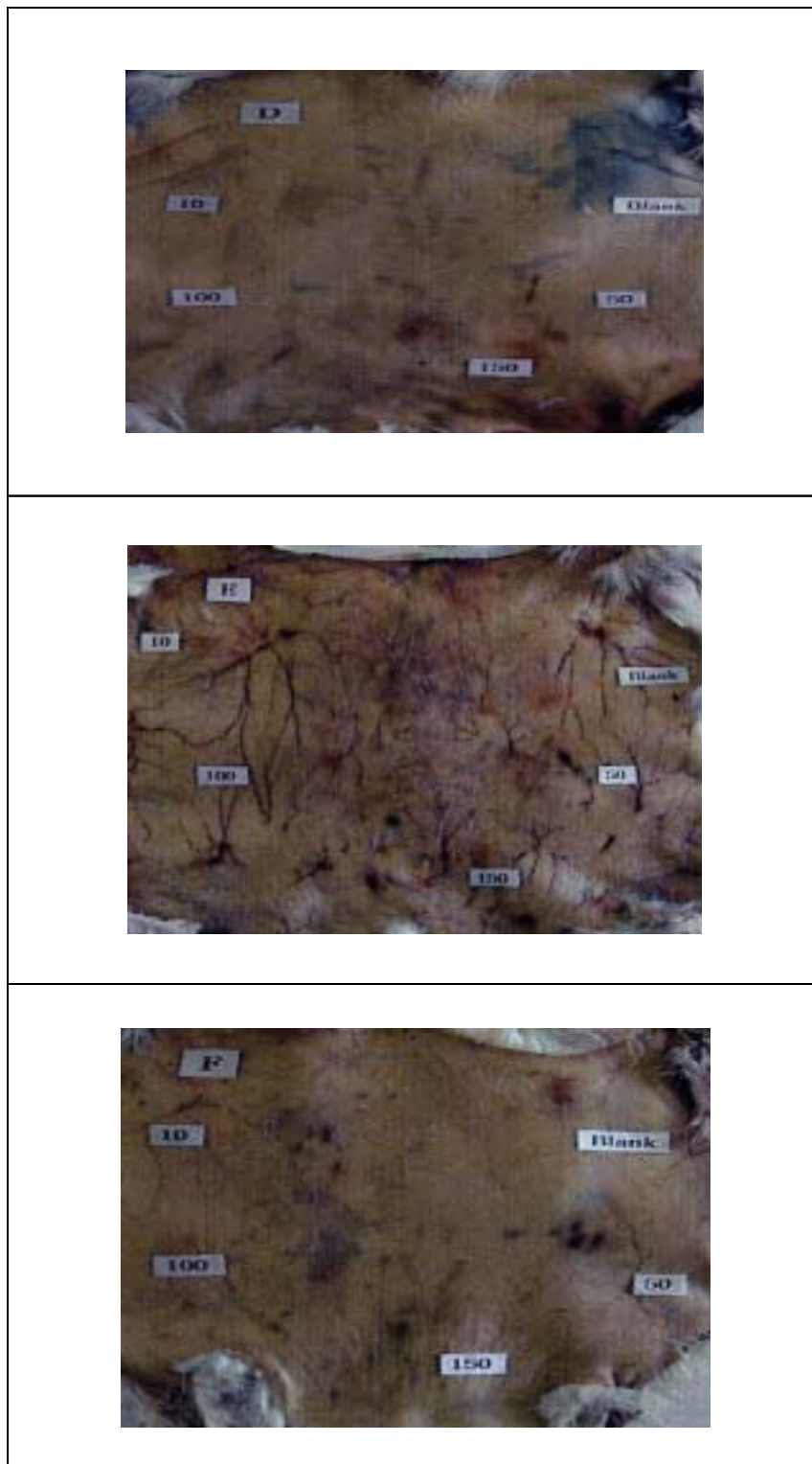


Fig 45. The skin of PCA in infant formulas D-F

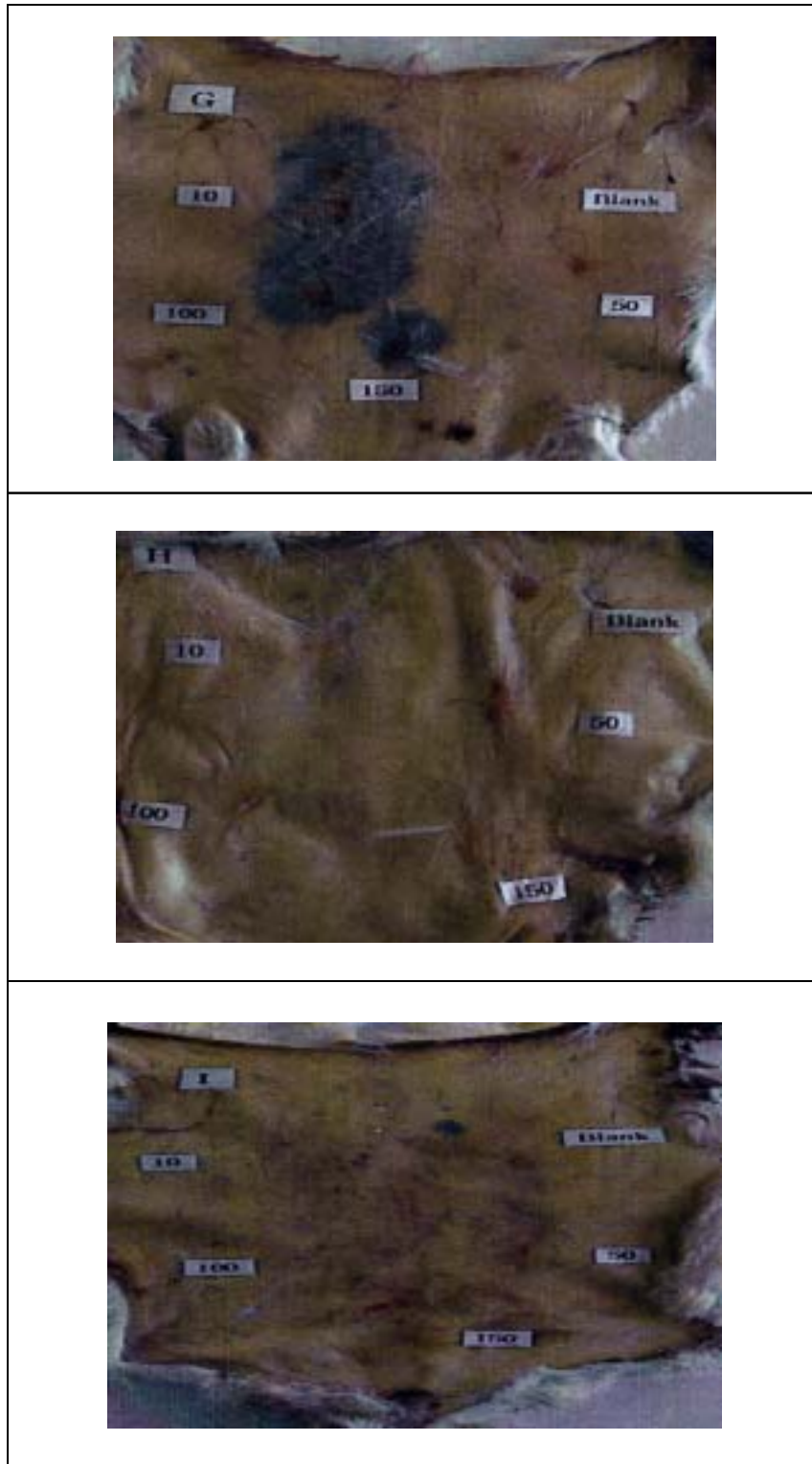


Fig 46. The skin of PCA in infant formulas G-I

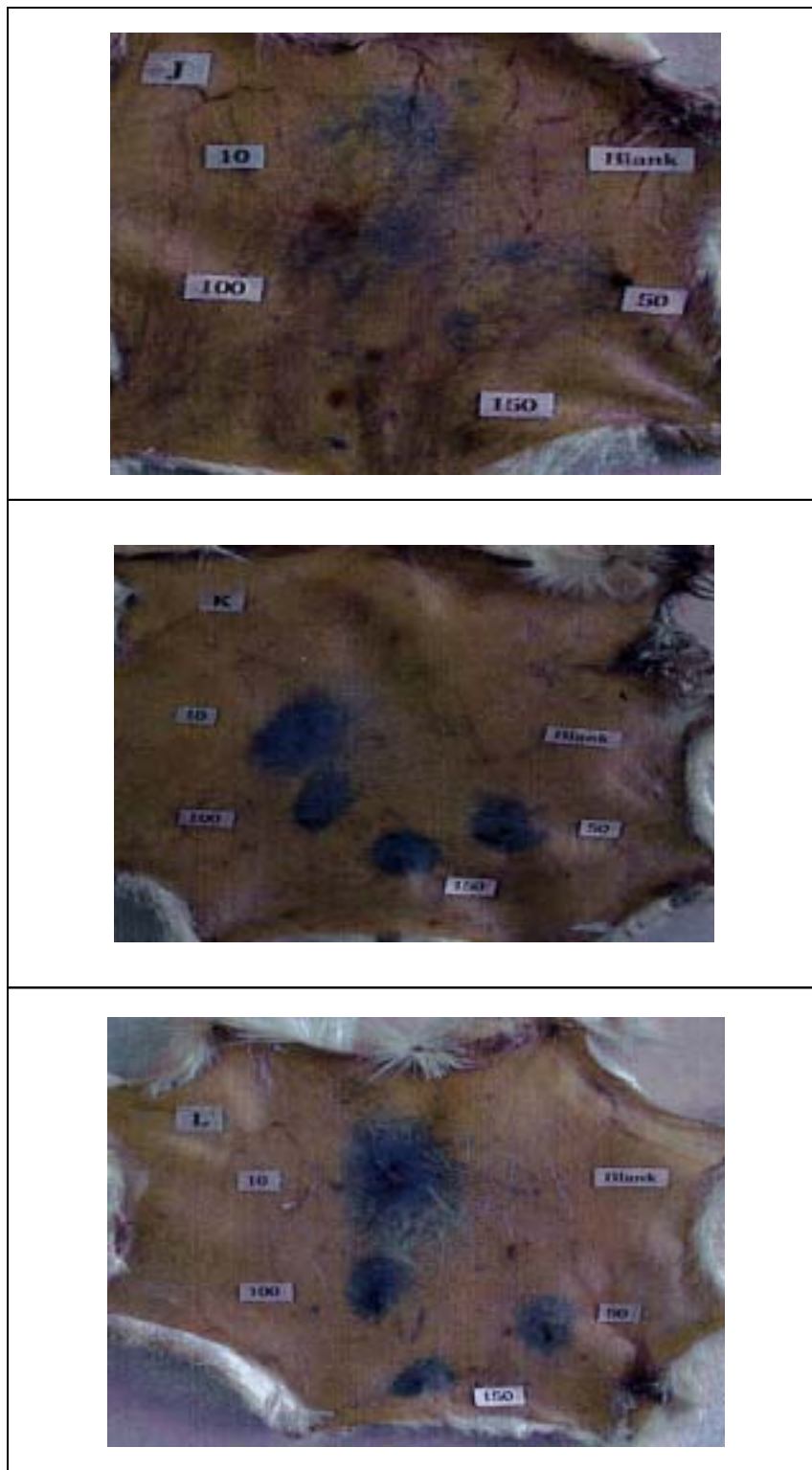


Fig 47. The skin of PCA in infant formulas J-L



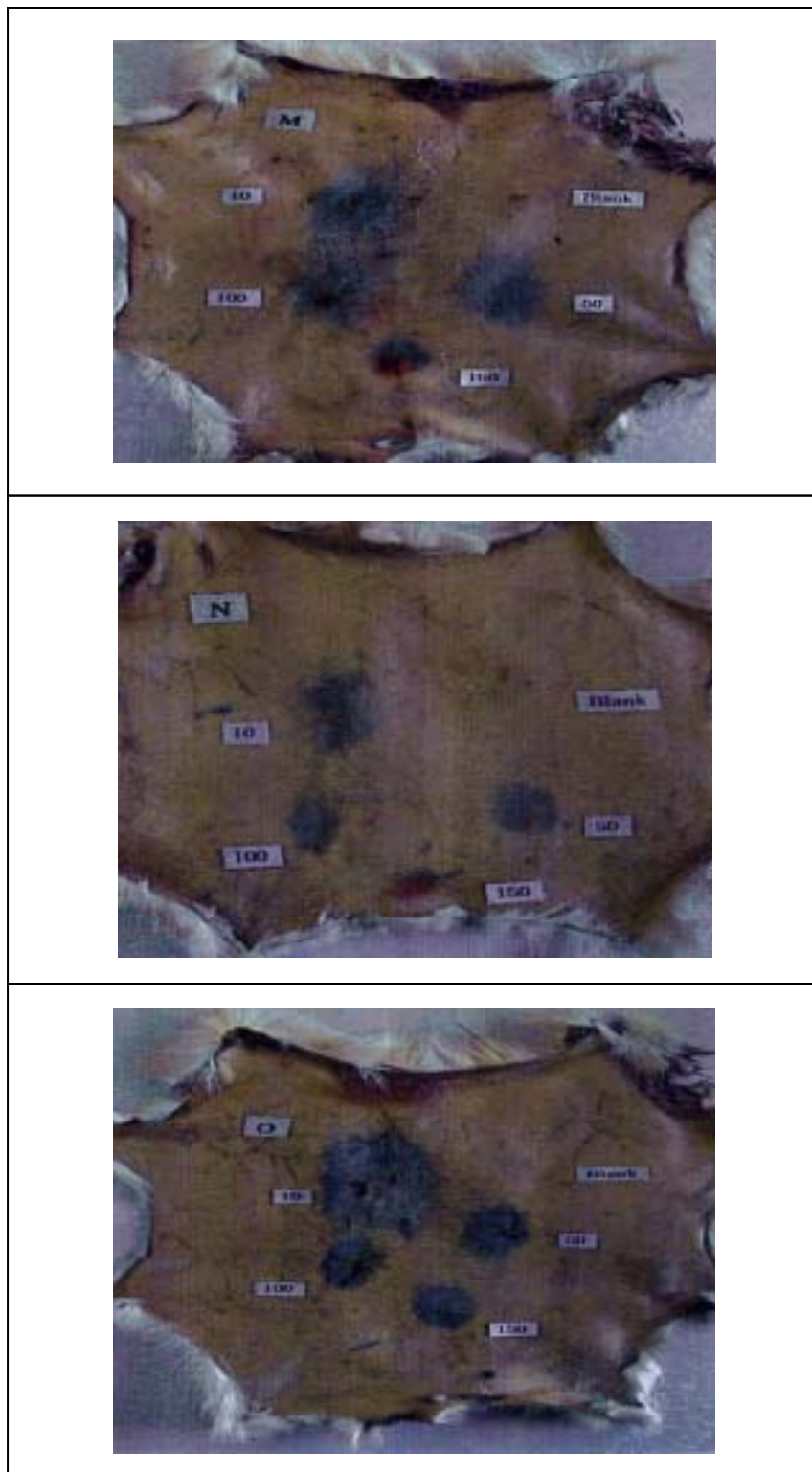


Fig 48. The skin of PCA in infant formulas M-O

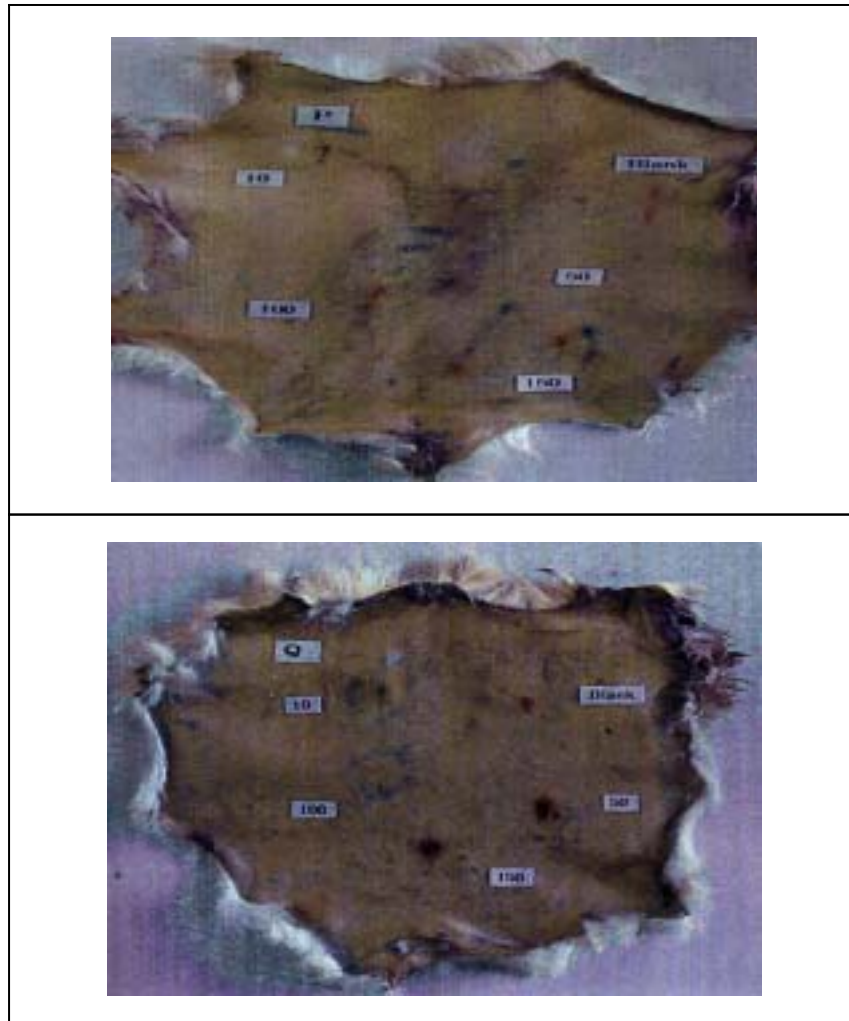


Fig 49. The skin of PCA in infant formulas P and Q

조제분유 A-Q까지의 PCA 결과는 Fig 44-49와 같다. 여기에서 보면 시판용 저 알레르기 외국산 조제분유 A-I, Q와 국산 J에서는 PCA의 결과는 allergy가 없다는 결과를 얻었다. 이것은 hypoallergy 조제분유로 단백질을 저단백으로 가수분해 시켜 allergy 반응이 나타나지 않은 것으로 보인다. Halken 등(1995)은 allergy 질병의 위험에서 아기에 대한 hypo-allergic formulas의 효과를 연구하였다. 또한 Isolauri(1995)는 milk allergy의 치료에 대해 조제분유 제조시 광범위하게 가수분해시킨다고 하였다.

하지만 그 외 K-P의 경우에 있어서는 그렇지 못했다. 즉 allergy가 있는 것으로 나타났다.

2) 조제분유에 대한 전자현미경적 관찰

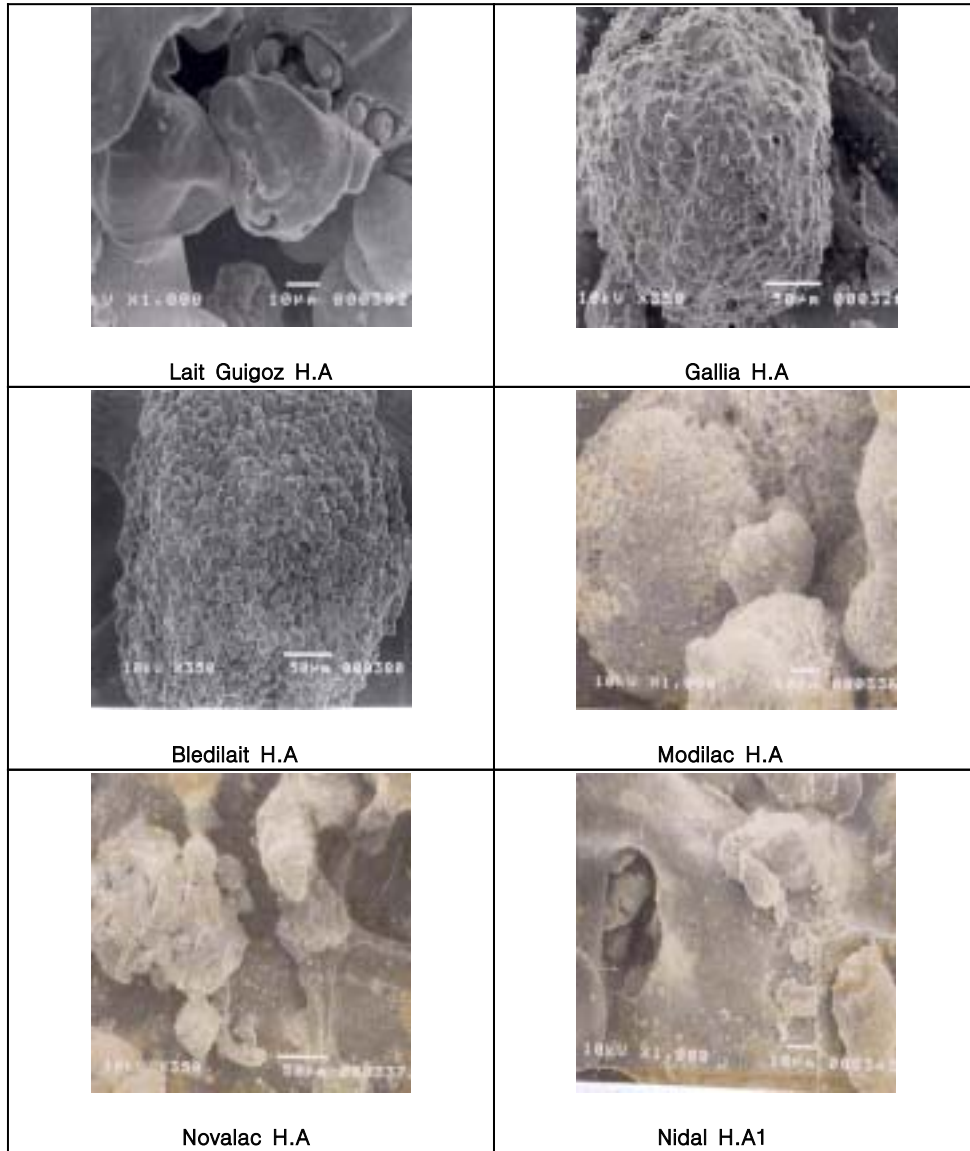


Fig 50. Observation of SEM for infant formulas of domestic and foreign(plate I)

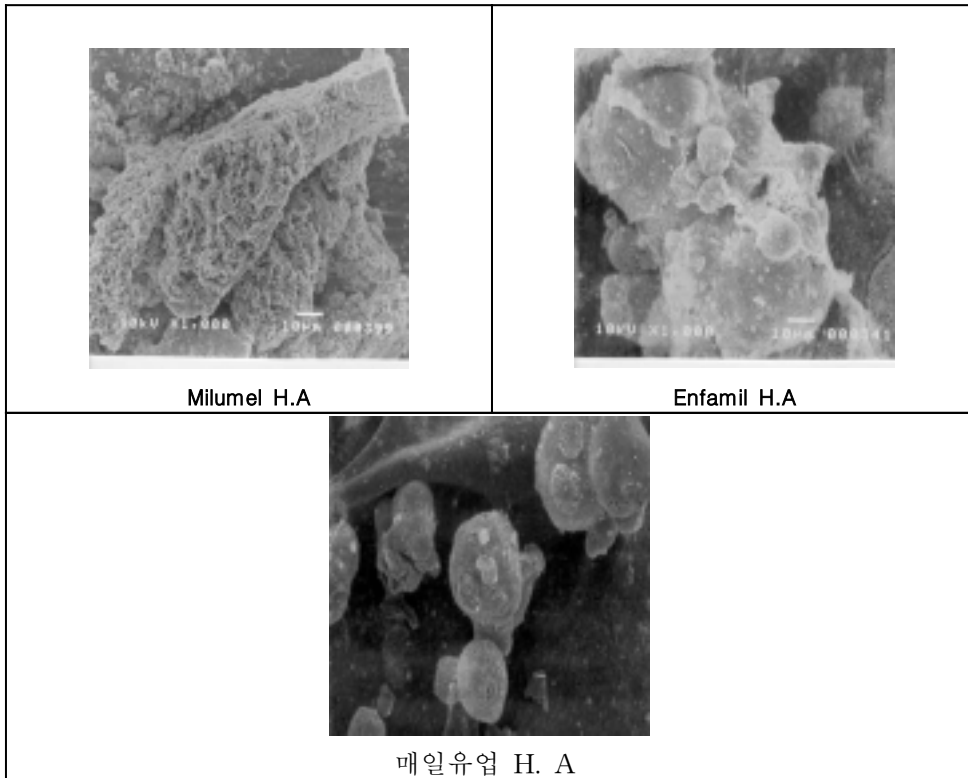


Fig 51. Observation of SEM for infant formulas of domestic and foreign(plate II)

전자현미경에서 보면 국산이 더 입자가 고른 것을 볼 수 있고 용해도는 둘 다 좋다.

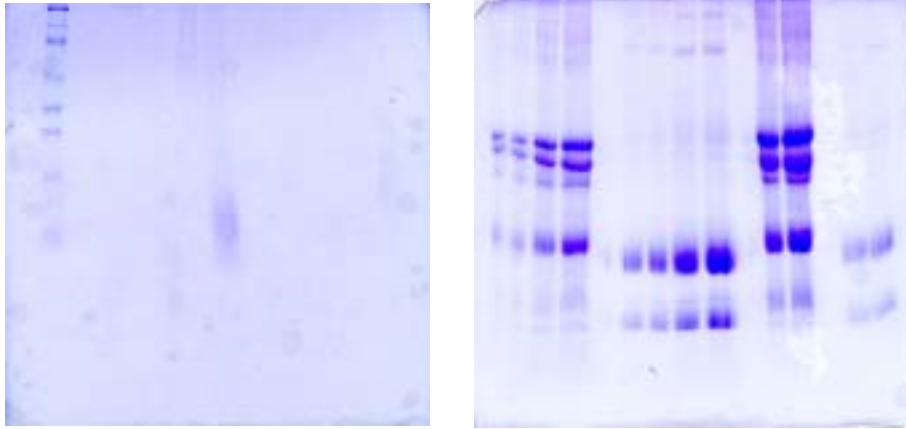
3) 조제분유에 따른 질소분획

Table 11은 국내외 조제분유의 질소 분획은 나타내었다. 여기에서 보면 외국의 저알레르기 조제분유에서는 NPN의 함량이 52-85%까지 인데 비해 국산 조제분유에서는 NPN 함량이 94%로 너무 많은 단백분해가 일어난 것으로 보인다. 이것은 좀 문제가 있지 않은가 한다. 왜냐하면 너무 많은 단백분해로 쓴맛의 출현과 신장의 부담을 줄 수 있다고 본다. 따라서 과다하게 단백분해가 되지 않고 알레르기를 억제할 수 있는 공정도출이 필요하다고 본다. 다음은 조제분유의 전기영동적 차이이다.

Table 11. Distribution of Nitrogen in infant formulas

Commercial names	Peoperties	NT	NPN/NT	NCN/NT	(NPN/NT)/(NCN/NT)
Lait Guigoz H.A	Hypoallergenic	2.44	63.5	65.6	96.8
gallia H.A	Hypoallergenic	2.59	58.7	61.0	96.2
Bledilait H.A	Hypoallergenic	2.50	52.8	56.4	93.6
modilac H.A	Hypoallergenic	2.24	95.1	97.3	97.7
novalac H.A	Hypoallergenic	2.33	86.3	91.0	94.8
Nidal H.A1	Hypoallergenic	2.42	70.2	82.2	85.4
Milumel H.A	Hypoantigenic	2.32	81.0	90.5	89.5
Enfamil H.A	Hypoallergenic	2.04	85.3	91.7	93.0
Petitjounior	Nutrition	2.53	99.6	101.6	98.0
Bledilait 1	Nutrition	1.71	8.8	21.1	41.7
lait materna	Nutrition	1.91	15.2	41.4	36.7
modilac	Sans lactose	1.92	9.9	16.7	59.3
pre-Bledilait	Nutrition	2.36	8.5	32.2	26.4
Similac	Nutrition	1.59	10.1	23.9	42.3
Isomil	Nutrition	2.21	24.4	38.0	64.2
후디스투루맘	Nutrition	1.68	17.9	50.6	35.4
에메랄드	Nutrition	1.84	26.6	64.1	41.5
로이트플러스	Nutrition	2.32	19.4	41.8	46.4
골드 뉴로히트	Nutrition	2.09	23.0	54.1	42.5
후디스 트루맘 닥터	설사	2.88	9.0	16.7	53.9
후디스 초유밀	초유	6.58	5.5	73.1	7.5
아기사랑	Nutrition	2.09	15.3	40.7	37.6
임페리얼드립	Nutrition	2.06	26.7	45.6	58.6
호프알레기	알레르기	2.48	27.0	46.8	57.7
호프닥터	설사	2.77	25.3	41.2	61.4
매일분유	Nutrition	2.01	15.4	30.8	50.0
엡솔루트	Nutrition	1.95	16.4	35.9	45.7
매일소이 A	알레르기	2.61	28.4	47.5	59.8
매일 MF-1(SF-1)	설사	3.60	6.9	13.1	52.7
매일맘마 HA-21	Hypoallergenic	1.94	94.3	103.6	91.0

4) 국내외 저 알레르기 조제분유의 전기영동적 차이



저 알레르기 조제분유

일반조제분유

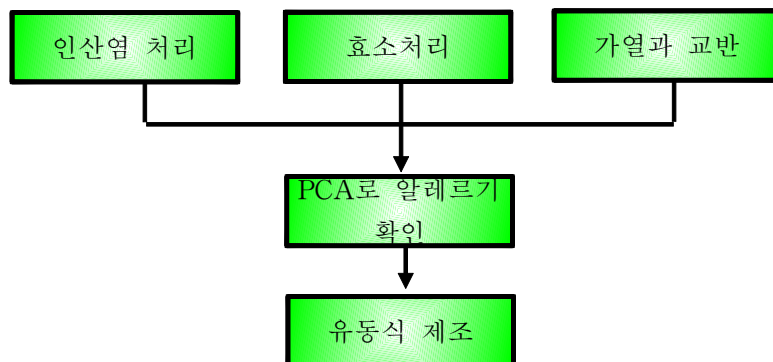
Fig 52. Change of electrophoretic for infant formulas

일반조제분유와 저알레르기 조제분유의 전기영동적 차이는 Fig 52와 같이 유단 백질들이 가수분해가 된것을 볼 수 있다. 질소분획에서 보듯 NPN의 함량이 증가하여 어떠한 band도 보이지 않는 것을 볼 수 있다. 국산과 외국산의 전기영동적 차이는 나타나지 않았다.

## 제 8 절 특이식 제조

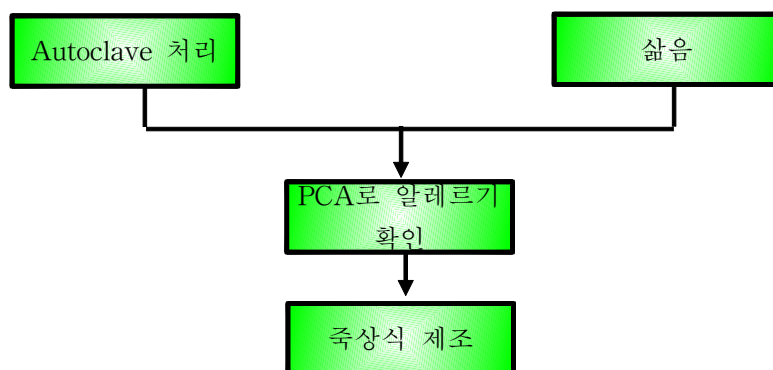
### 1. 유동식(고기)

유동식은 저 allergy 처리된 고기를 이용하여 가열과 교반을 통해 제조한다. 이때의 저 allergy 처리는 천연효소 즉 키위를 오랫동안 처리하면 거의 액상으로 가깝게 된다. 즉 유동식이다. 그 공정은 다음과 같다.



### 2. 죽상식(고기)

고기를 Autoclave 30분하고 오랫동안 삶는다. 그래서 고기 맛이 나게 하여 죽상식을 제조한다. 소화전처리를 하여 소화를 용이하게 한다. 예를들면 쇠고기 에다가 우유와 다른 양념을 넣어 만드는 쇠고기 죽상식을 제조한다. 쇠고기 대신에 다른 고기를 대신해서 제조해도 된다. 그 공정은 다음과 같다.



### 3. 고 단백질(고기)

지방이 없는 고기만을 가지고 제조하는데 여기에 탈지분유를 첨가하여 제조한다. 이 때도 역시 저 알레르기 처리된 고기를 이용한다. 저 알레르기 처리는

가열과 autoclave 등을 통해 처리하여 고 단백식을 제조한다.

#### 4. 저알레르기 우유

도출된 저알레르기 처리 공정을 거쳐 저알레르기 우유를 제조하는 것이다. 저 알레르기 우유를 개발한다 해도 유당불내증이 아이들에게는 문제가 될 수 있다. 이를 위해 유당을 발효과정을 통해 분해시킨 후 최종 알레르기 실험을 통해 제품을 제조한다. 음용유로 할 수 있고 각종 특이식 원료로 사용한다. 이 때 저 allergy 처리는 인산염처리 후 NaOH 처리 그 다음에 10분간 autoclave를 하여 처리를 한다. 물론 저 allergy 유무 후 제조한다.

#### 5. 이유식(단계별 이유식 영양간식, 2001)

저알레르기 처리된 우유와 여기에 맛을 좋게 하기 위해 고기를 첨가하여 제조한다. 즉 끓는 물에 고기를 넣고(저 allergy 처리) 고기를 잘게 썬다. 우유도 역시 끓인다. 이 두 원료를 섞어 냄비에 넣고 조리 다음 이유식으로 사용한다. 물론 원료 제조 후 혼합 배합하여 알레르기실험 통해 저 알레르기 확인 후 제품을 제조한다.



## 제 9 절 의학적 평가-western blotting

1. 저알레르기 처리된 항원에 대한 인간혈청의 western blotting의 변화

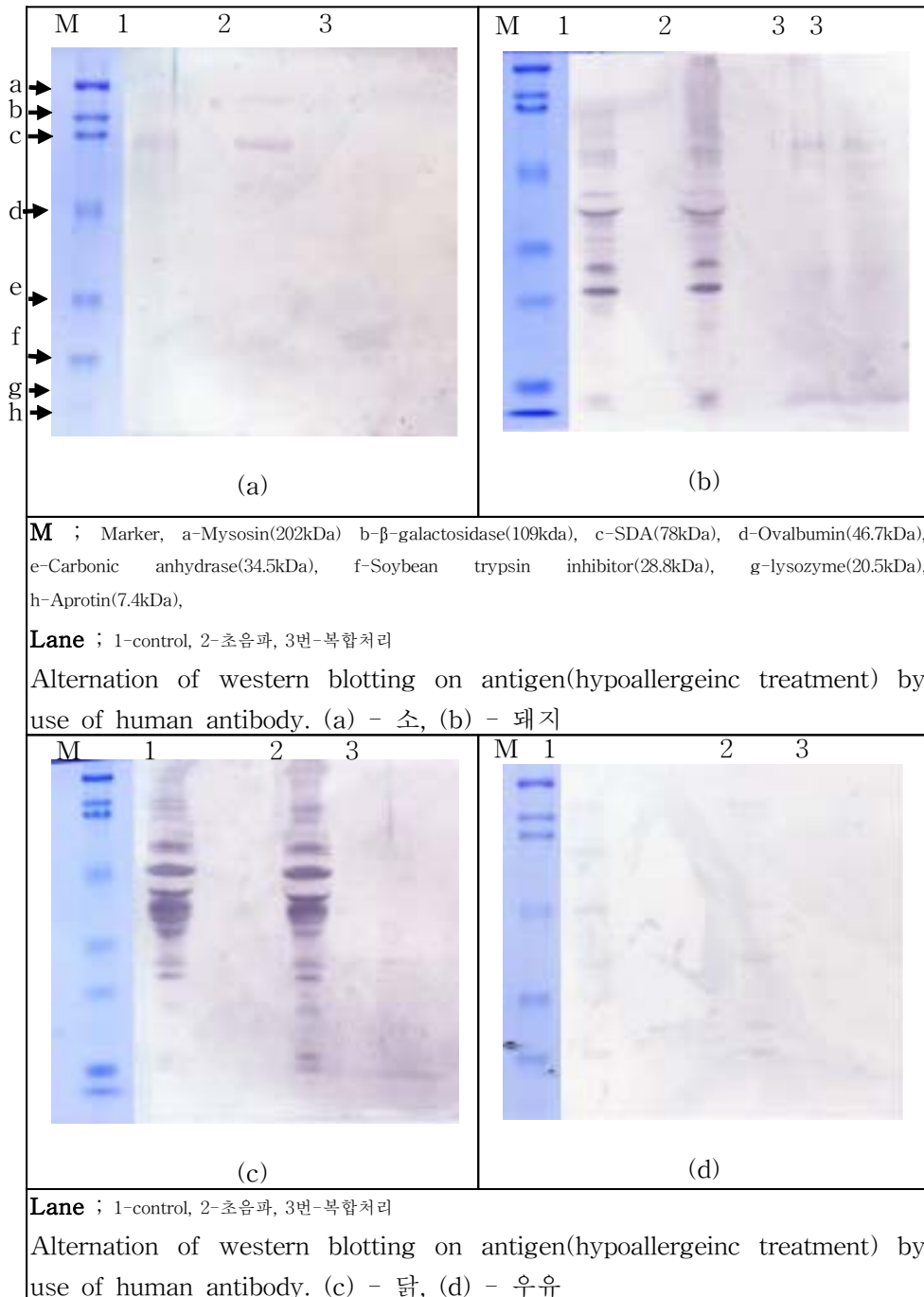


Fig 53. Change of western blotting for hypoallergic treatment in human antibody

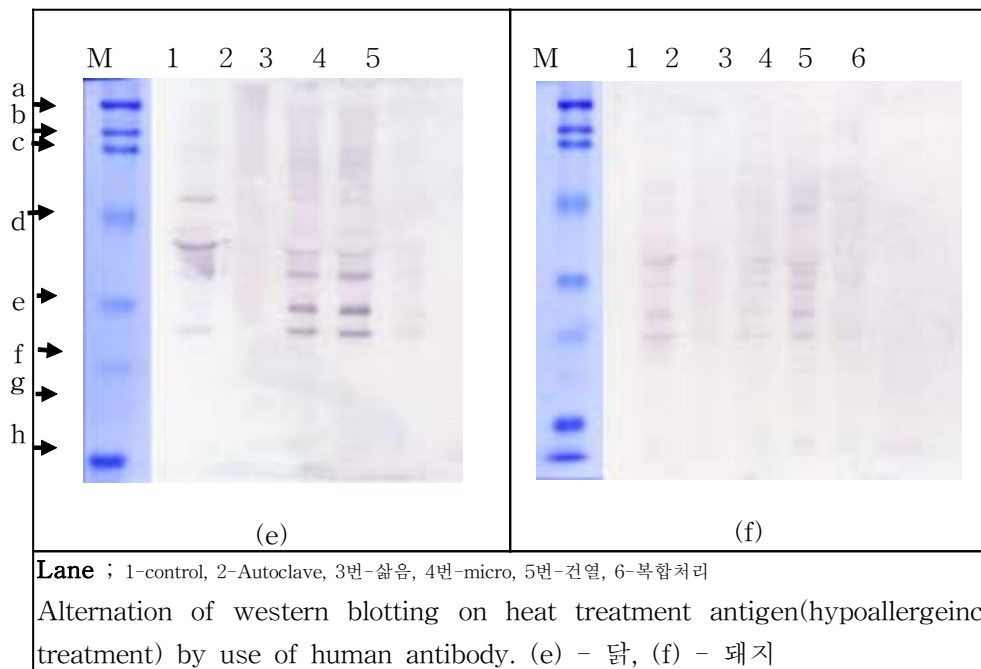


Fig 54. Change of western blotting for hypoallergic treatment(heating) in human antibody

환자혈청에 대한 의학적 평가 즉 western blotting의 평가는 Fig 53와 54에 나타나 있다. 즉 저 allergy 처리된 고기와 우유에 대한 결과이다. Fig 53에서는 control과 비교시 초음파 처리는 그다지 allergy가 감소가 되지 않음을 볼 수 있는데 복합처리의 경우에는 감소되는 현상을 보이고 있다. Fig 54은 가열처리된 시료에 대해 환자혈청의 반응성을 본 것으로 닭이나 돼지고기 모두 autoclave와 복합처리를 했을 때 억제가 최대로 되는 것을 볼 수 있다. 고로 이 처리에서는 allergy를 환자혈청에서도 억제함을 알 수 있다.

이는 가열로 인해 단백질의 구조가 변하여 생기는 것으로 사료된다.

Fig 55는 환자혈청에 대한 공통 반응성을 확인한 것이다. 이 결과도 역시 앞에서 서술한 동물혈청과 마찬가지로 환자혈청도 살부위는 살부위끼리 반응을 일으키는 것을 볼 수 있다. 이것은 소고기, 돼지고기, 닭고기에서 다 마찬가지이다. 우유와 고기와는 공통 반응성이 인정되지 않았다. 즉 이것은 유단백하고 고기단백의 구조 차이가 인한 것으로 사료된다.

2. 저알레르기 처리된 항원에 대한 인간혈청의 공통항원성 평가

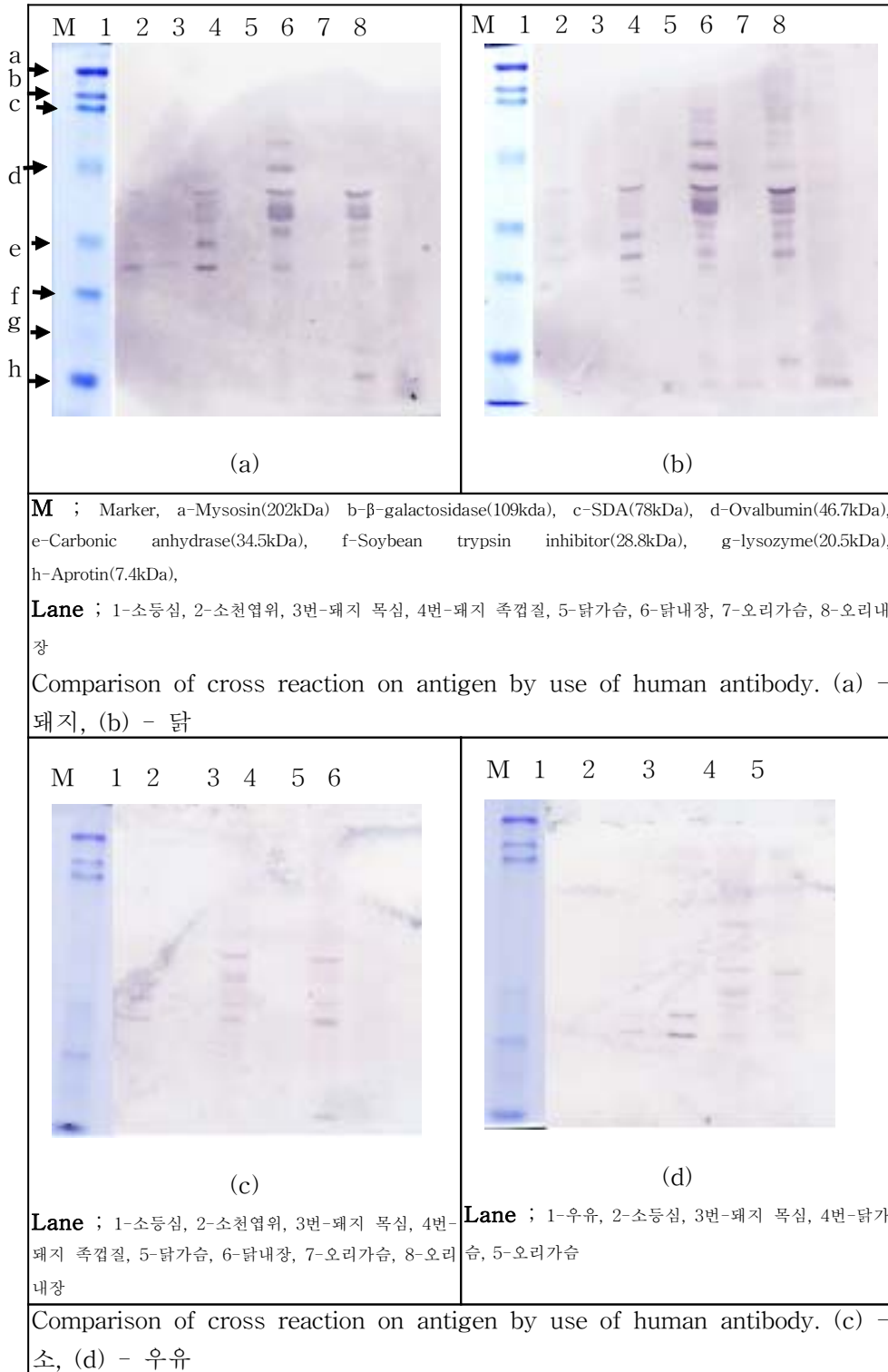


Fig 55. Change of western blotting for cross reaction in human antibody

## 제 10 절 진단용 allergen 조정제

### 1. 각 추출물에 대한 전기영동적 변화

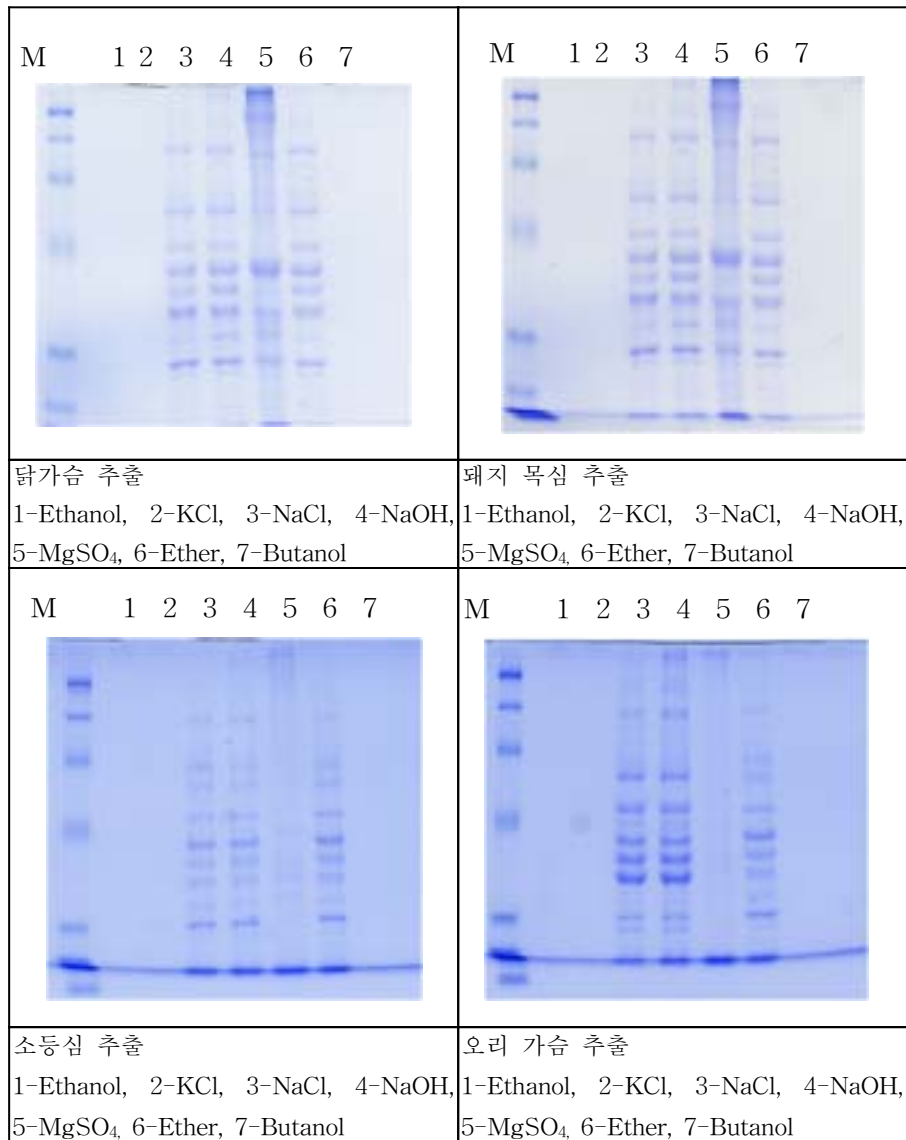


Fig 56. The electrophoretic change on allergen extracts in meat

Fig 56는 본 연구에서 용매별로 추출한 알러젠들의 전기영동적 변화이다. 여기에서 보면 KCl, NaCl, NaOH, MgSO<sub>4</sub>에서 추출한 것들이 전기영동상에서 선명한 band를 나타내고 있다. 또한 각 고기에서 전기영동적 변화는 없다는 것을 알 수 있다.

Fig 57은 시판되고 있는 진단용 알러젠의 전기영동적 변화이다. 우유와 계란을

제외하고는 고기에 대한 알러젠들의 전기영동적 변화는 비슷하다는 것을 알 수 있다. 이것은 우리가 제조한 알러젠과의 전기 영동적 변화하고도 차이가 없음을 보여주고 있다.

## 2. 시판 진단용 알러젠의 전기영동적 변화

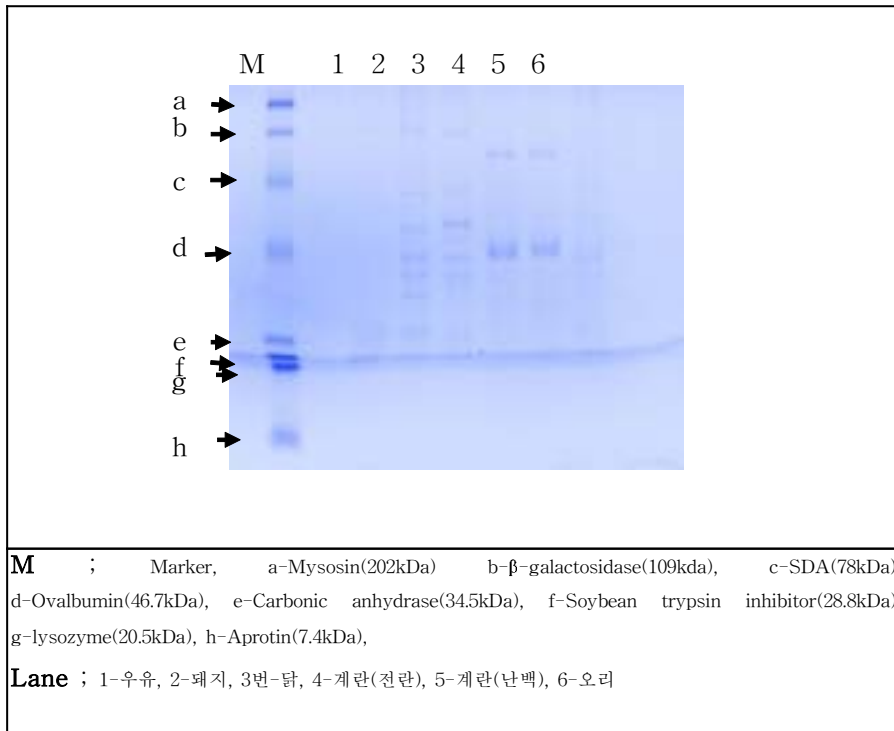
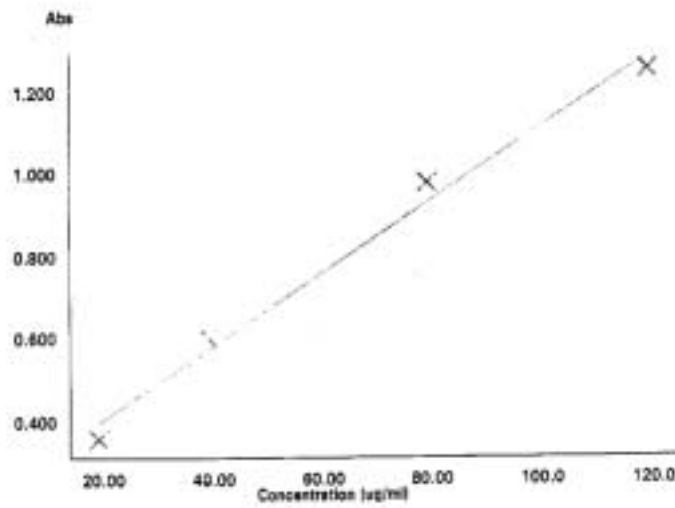


Fig 57. The electrophoretic change on commercial allergen as diagnosis in meat

진단용 알러젠 제조는 정확한 monoclonal antibody를 제조한 다음 살부위간 반응하는 문제를 해결할 수 있을 것으로 보인다.

### 3. Lowry법에 의한 단백질 정량



$$Y=0.008862X+0.2237, R^2=0.9877$$

Fig 58. Standard curve by use of BSA

Table 12. Determination of protein by use of Lowry method(ug/ml)

축종 \ 용매	알콜	KCl	NaCl	NaOH	MgSO <sub>4</sub>	Ether	Butanol
소	4.491	21.022	9.682	38.626	10.866	-0.245	0.090
돼지	0.598	10.415	12.841	36.425	14.139	3.137	-0.9253
닭	5.281	12.108	11.374	20.345	14.251	-0.023	-0.304
오리	0.824	11.374	11.769	22.714	11.374	0.993	0.429

본 연구에서 가 용매에 의해 추출한 고기에 대한 단백질의 양은 Table 12에 나타나 있다. 여기에서 보면 추출이 NaOH에서 가장 많이 추출되는 것을 알 수 있다. 그리고 유기용매의 경우에는 거의 추출되지 않은 것으로 나타났다. 또한 KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>에서는 서로 비슷하게 추출되었음을 보여주고 있다. 따라서 이 용매에 의해 추출물들은 시판 진단용 알러젠과 비슷하다고 할 수 있다.

4. 한외여과 분획물의 PCA

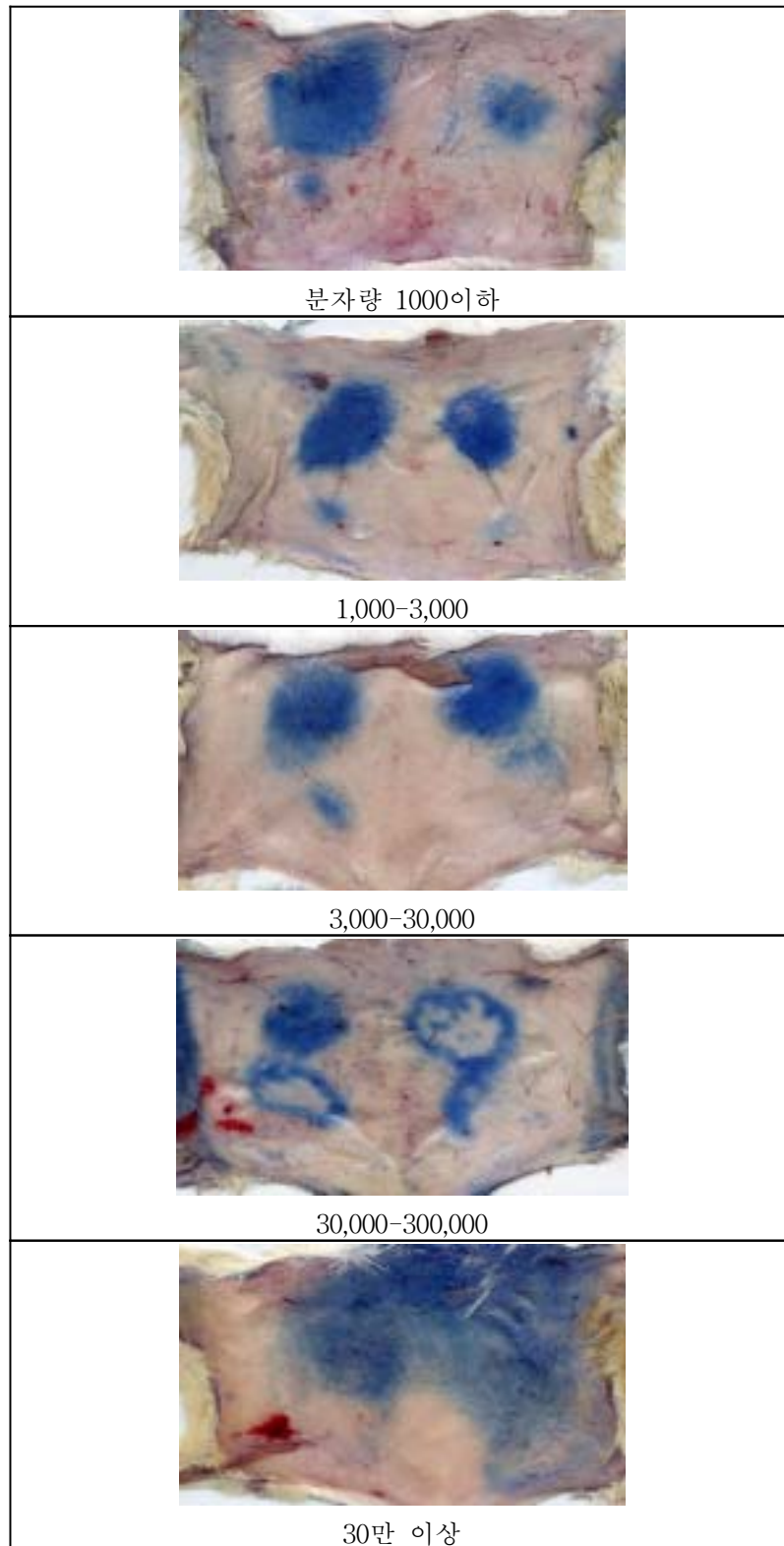


Fig 59. The skin of PCA by ultrafiltration in meat

Fig 59은 본 연구에서 추출한 알러젠을 분자량별로 한외여과 시킨 후 그 분자량별 분획을 PCA를 한 결과이다. 결과에서 보듯이 분자량에 관계없이 모두 allergy 반응이 일어난 것을 볼 수 있다. 그러므로 본 연구에서 추출한 알러젠으로 알러젠을 이용하면 알레르기 환자의 경우에 있어 알레르기 유무를 확인할 수 있다고 사료된다.



4) allergen의 물리적 안정성 및 allergen의 생물학적 안정성

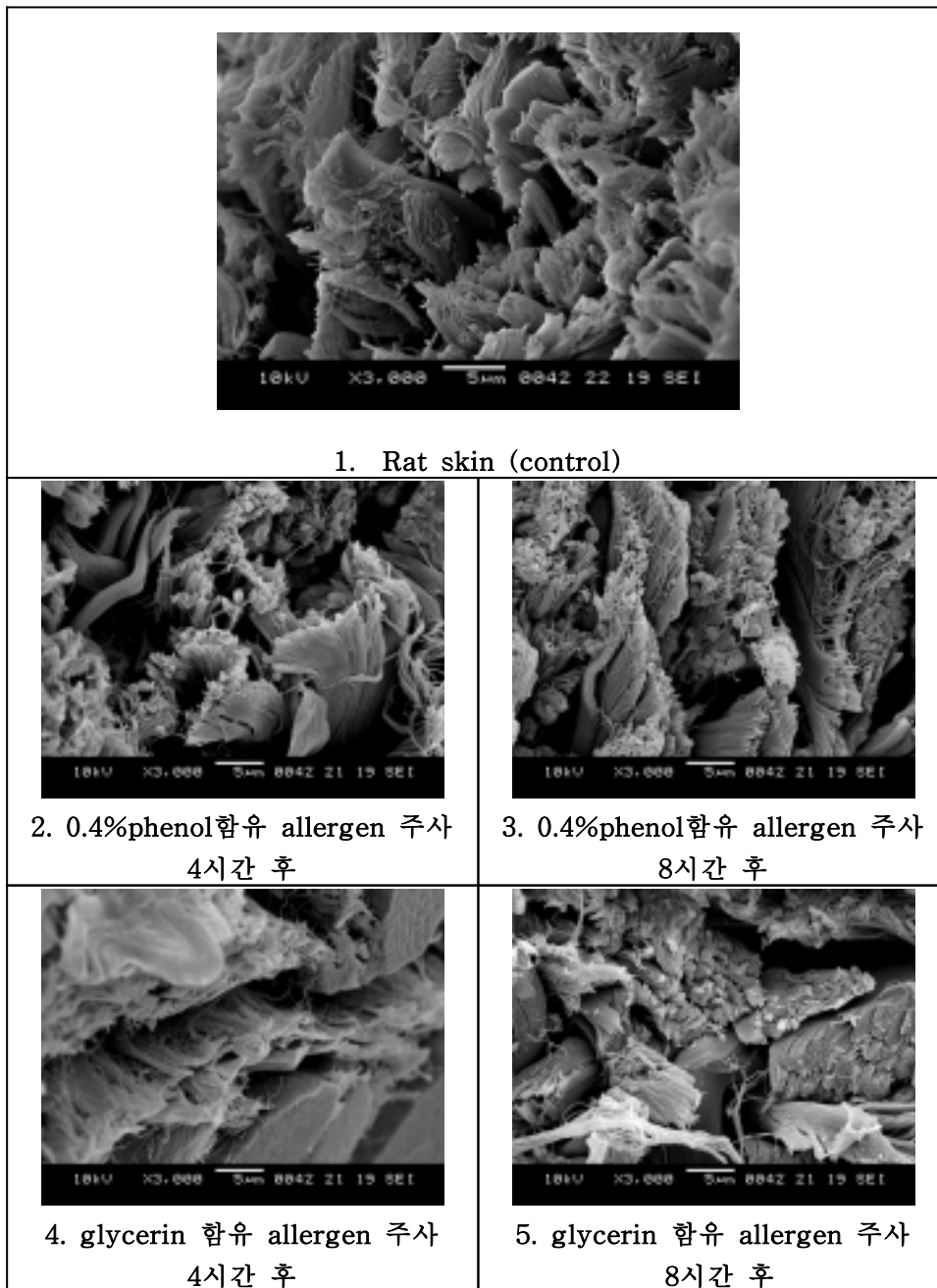


Fig 60. Observation of SEM on biological stability

Fig 60은 알러젠의 생물학적 안정성을 rat skin에 반응시켜 SEM으로 관찰한 것이다. 이것은 결과에서 보듯이 phenol 함유한 allergen 주사 시나 glycerin 함유한 allergen 주사 시 control과 비교 시 별다른 차이가 없음을 볼 수 있다. 이는 제조한 두 가지 allergen이 모두가 생체적으로 안정함을 증명한다. glycerin

의 물리적 안정성은 용해성을 안정화시키는 것을 나타냈다. 이는 Varjonen 등 (1996)이 cereal 알러젠의 안정성을 평가한 결과와 유사하였다. 이는 glycerin이 solibility를 안정화시킨다고 볼 수 있다.

## 제 10 절 VBN의 변화

VBN(volatile basic nitrogen)의 산패실험에 많이 이용되는 것이다. 이 실험은 VBN의 증가로 allergy가 있으며 탈과립되는 histamine과 관계가 깊다. 주요 식품에서 산패 반응은 Table 13에 나타나 있다.

Table 13. Major food deterioration reactions(Gould, 1996)

반응	예와 영향
물리적	조직의 건조와 거칠게 하는 수분운동 수화와 조직연화, 응고
화학적	산화적 악취의 원인인 산화, 색의 손실 탈색원인인 Maillard 반응, 조직의 변화
효소적	효소에 의한 갈변의 원인인 polyphenoloxidase 산화적 악취의 원인인 lipoxygenase 지방악취의 원인인 lipase 조직변화, 향미, gelatin을 야기하는 protease
미생물학적	부패균의 성장 독성균의 성장 감염균의 존재

축종간 고기의 VBN의 변화는 Table 14와 15에 나타나 있다. Table 14는 생고기를 가지고 측정한 것이고 Table 15는 삶은 고기를 가지고 실험한 것이다. 여기에서 보면 처음에는 별 차이가 없다가 시간이 지날수록 그 차이가 나타나는 것을 볼 수 있다. 돈육, 계육이 소고기보다 더 VBN이 증가되는 것을 볼 수 있다(Table 14). 삶은 고기에서는(Table 15) 에서도 역시 시간이 지날수록 즉 48시간이 되었을 때 돈육과 소고기의 VBN 수치가 현저히 차이가 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 산패하는 동안 histamine이 많아진 결과이다. 이 histamine은 allergy가 아닌 것은 다 아는 사실이다. 이와 같은 결과는 Yamanaka 등, (1987)이 산패 실험에서 돈육, 계육에서 VBN증가되어 histamine양과 관계가 있다는 사실과 같다.

Table 14. Change of VBN(volatil basic nitrogen) per 1g of meat according to storage times

시료	0h	24h	48h
소등심	0.093	0.448	1.582
닭가슴	0.072	0.523	4.118
돼지 목심	0.072	0.587	3.426
오리가슴	0.095	0.490	1.523

Table 15. Change of VBN(volatil basic nitrogen) per 1g of meat according to storage times(boiling)

시료	0h	24h	48h
소등심	0.050	0.101	0.560
닭가슴	0.046	0.204	0.364
돼지 목심	0.042	0.204	0.967
오리가슴	0.052	0.280	0.662

## 제 11 절 발효유에서 항알레르기 인자의 검색 (문용일, 우석대학교)

### 1. 유산균 배양

Sephadex G-50 column에서 *Lactobacillus bulgaricus* 배양액으로부터 분리한 유청을 분별한 결과는 Fig 61과 같다.

Fig.6에서 보는바와 같이 10%환원 탈지유를 배지로 사용한 균배양액으로부터 원심분리하여 얻은 上淸液을 Sephadex G-50 gel filtration을 통해 分別한 결과 fraction 1, fraction 2 및 fraction 3의 3개의 분획이 용출되었다.

이중 void volume 부근에서 분획인 fraction 1은 Sephadex G-50의 분자량에 따른 fraction range로 볼 때 그 분자량이 30,000dalton 이상인 물질로 보여진다.

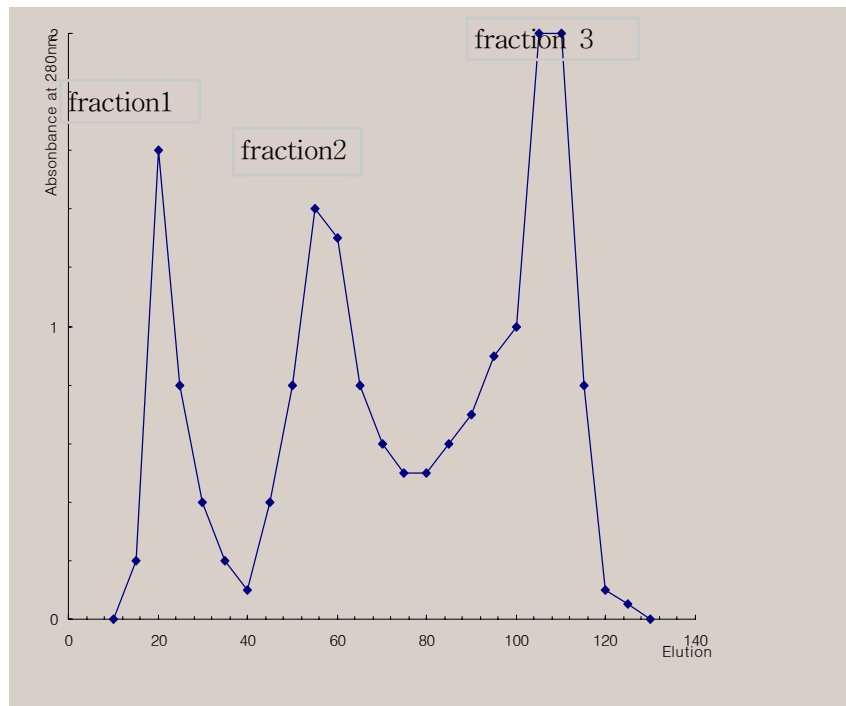


Fig. 61. Elution profile of whey separated from *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 1121 culture on Sephadex G-50 gel filtration.

또한 bed volume 부근에서 分別된 fraction 2는 Sephadex G-50의 分別 범위로 볼 때 그 분자량이 1,500~30,000dalton 범위내의 물질인 것으로 생각된다.

그리고 elution volume 부근에서 分別된 fraction 3은 그 분자량이 Sephadex G-50의 分別범위로 볼 때 1,500dalton 이하의 Small peptide들로 보여진다.

Sephadex G-50 column에서 *Streptococcus thermophilus* 배양액으로부터 분리

한 유청을 분별한 결과는 Fig 62와 같다.

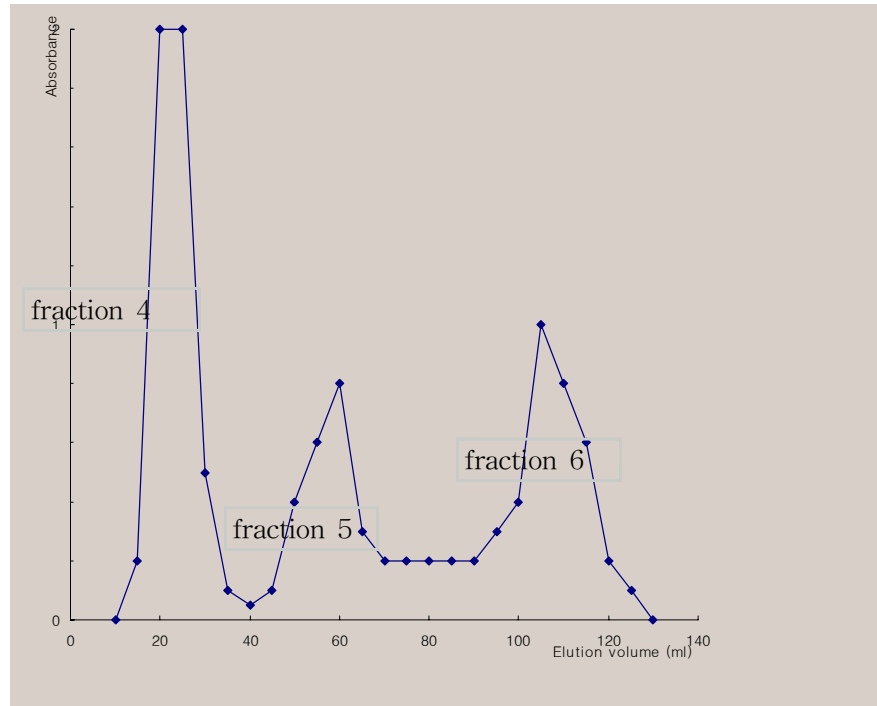


Fig 62. Elution profile of whey separated from *streptococcus thermophilus* KCTC 2185 culture on Sephadex G-50 gel filtration.

Fig 62에서 보는바와 같이 10%환원 탈지유 배지로 사용한 균배양액으로부터 원심분리하여 얻은 上清液을 Sephadex G-50 gel filtration을 통해 분별한 결과 fraction 4, fraction 5 및 fraction 6의 3개의 분획이 용출되었으며 *Lactobacillus bulgaricus* 菌株를 사용하여 배양한 배양액으로부터 분리한 유청을 분별한 Fig 60의 결과와 동일한 양성을 나타내었는데 Fig 60과 Fig 61의 두 결과를 비교분석하여 보면 *Streptococcus thermophilus* 菌株는 그 분자량이 30,000dalton보다 큰 fraction 4 peak의 경우 *Lactobacillus bulgaricus* 菌株의 결과인 fraction 1 peak보다 그 양이 많고 또한 분자량이 1,500dalton이하인 fraction 6 Peak는 *Lactobacillus bulgaricus* 菌株의 실험결과인 fraction 3 peak 보다 그 양이 적은 것으로 나타나 *Streptococcus thermophilus* 菌株는 *Lactobacillus bulgaricus* 菌株에 비해 단백질 분해능이 낮은 것으로 조사되었다.

*Lactobacillus bulgaricus* 菌株 및 *Streptococcus thermophilus* 菌株를 混合菌株로 하여 배양한 배양액으로부터 분리한 유청을 분별한 결과는 Fig 63와 같다.

Fig 62에서 보는바와 같이 그 분자량이 1,500dalton 이하인 fraction 9의 peak가 크게 증가한 결과를 보여주었는데 이는 *Lactobacillus bulgaricus* 및 *Streptococcus thermophilus* 두 菌種을 혼합 배양하면 서로 共生作用에 의해서

두 菌種의 발육촉진 효과, 산생성작용 촉진 및 단백질 분해능이 증가 등의 효과가 나타나며 그 내용으로는 *Lactobacillus bulgaricus* 가 우유 단백질을 분해하여 생성한 아미노산중에 valine, histidine, methionine, glutamic acid 및 leucine의 5종류의 아미노산이 *Streptococcus thermophilus*의 생육을 촉진하는데 이들 중에서도 valine이 가장 효과가 크며 이들 아미노산 단독으로는 촉진효과를 나타내지 않고 혼합첨가하여야 효과가 나타나며 또한 *Streptococcus thermophilus*에 의한 *Lactobacillus bulgaricus*의 생육 촉진효과를 나타내는 물질은 formic acid 와 pyruvic acid의 두 물질로서 이들이 *Lactobacillus bulgaricus*의 생육을 촉진하여 산생성능 및 단백질 분해능을 증가시켰다는 Rasic 및 kurmann(1978)의 보고와 동일한 것으로 조사되었다.

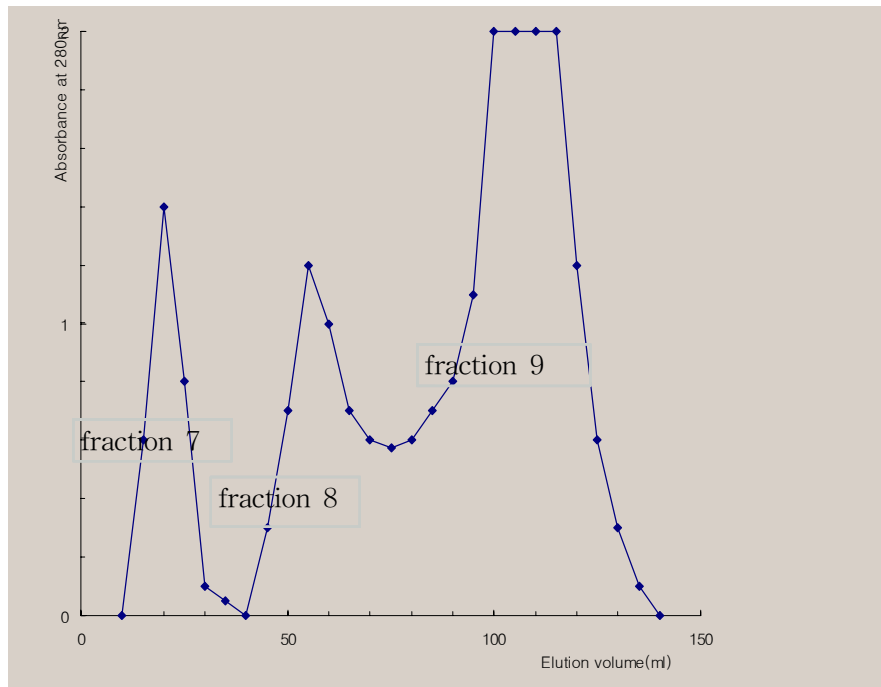


Fig 63. Elution profile of whey separated from *L. bulgaricus* and *Str. thermophilus* mixed culture on Sephadex G-50 gel filtration.

이는 앞으로 발효유산균 배양액으로부터 최대 단백분해 조건을 탐색하기 위한 본 실험의 목적에 방향을 제시해 줄 수 있는 결과로 사료된다. 한편 Sephadex G-10은 그 fractionation range가 700dalton이하의 peptide 그리고 Sephadex G-25는 그 fractionation range가 1,000~5,000dalton으로서 앞으로 더욱 세분화시킨 fractionation range를 가지고 이들 small peptide들에 대한 분리작업을 수행하는 것이 요구된다고 하겠다.

또한 본 실험의 결과 분별되어진 fraction 1 ~ fraction 9까지의 분획을 농축하여 동결건조한 후, 이를 다음 실험과정인 PCA (passive cutaneous anaphylaxis

)를 실시하여 어느 분획물이 항 알레르기인자를 높게 함유하고 있는가에 대한 실험 수행이 필요한 것으로 사료된다.

## 2. plsmid 검사

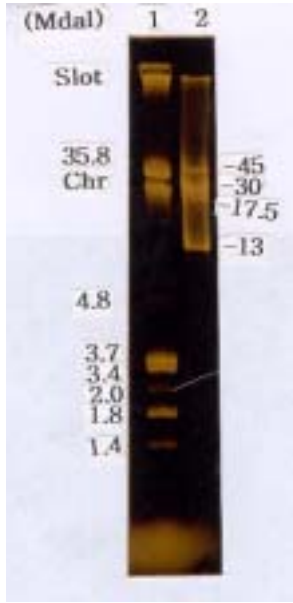
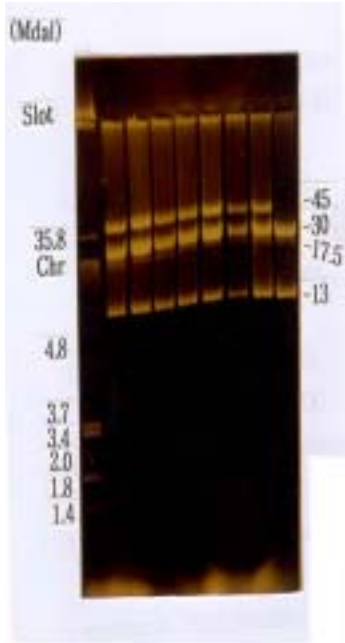
<i>Streptococcus therophilus</i> KCTC 2185	<i>Streptococcus thermophilus</i> KCTC 2185 and its mutant
	
Lane NO. 1) <i>E.coli</i> V517 2) <i>S. thermophilus</i> KCTC 2185	Lane NO. 1) <i>E.coli</i> V517 2-8) <i>S. thermophilus</i> KCTC 2185 9) <i>S. thermophilus</i> KCTC 2185 mutant 1.

Fig. 64. Agarose gel electrophoresis of plasmids of *Streptococcus therophilus* KCTC 2185 and *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185 and its mutant

Anderson 과 Mckay(1983)의 방법에 따라 plasmid를 정제하고 agarose gel 전기영동에 의해 조사한 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185 균주의 plasmid 조성은 Fig 64에서와 같다.

실험 균주는 Fig 64에서 보는 바와 같이 40, 30, 17.5 및 13Mdal의 4개의 plasmid를 가지고 있는 것으로 조사되었다.

한편 실험균주를 Acridine Orange를 사용하여 curing시킨 다음 얻어진 돌연변이주(Matant 1)의 전기영동 양상은 Fig 64에서와 보는 바와 같이 45Mdal의

plasmid가 상실된 것으로 조사되었다.

또한 이 *Streptococcus thermophilus* KCTC 2185 Matant 1의 genotype을 조사한 결과 wild type의 균주는 lactose를 당 대사에 이용하여 산을 생성시키는 반면 plasmid curing시켜서 얻어진 45Mdal의 plasmid가 상실된 Mutant 1 균주 (Fig 64의 두 번째 Lane 9)는 lactose를 당 대사에 이용하지 못하는 lactose negative genotype를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 실험균주의 lactose 대사에 관여하는 plasmid는 45Mdal plasmid로 생각할 수 있다.

한편 본 연구에서는 *Streptococcus thermophilus* 균주를 Acricine Orange를 이용하여 돌연변이를 유발시킨 다음 돌연 변이주를 선발하여 그 특성을 살펴보았는데 앞으로 항생물질 저항성 및 단백질분해능 등에 대한 다양한 실험 자료를 확보하고 이를 응용하여 발효 유제품에서의 기능성 물질 및 알레르기 유발인자 등에 대한 심도 있는 탐색이 필요한 것으로 사료된다.

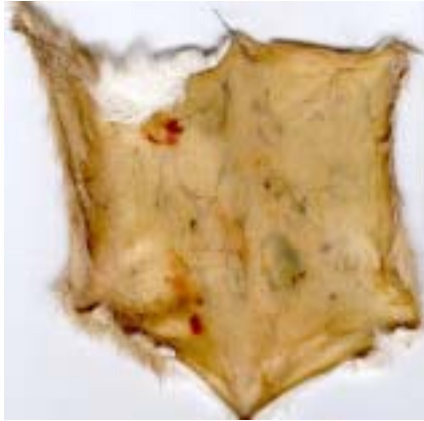
### 3. 알러젠성을 감소시키는 균주에 대한 PCA

사용된 균주는 다음과 같다.

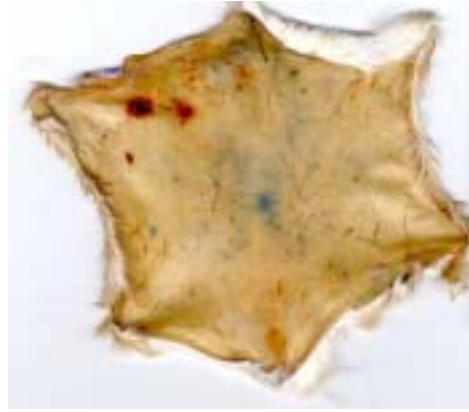
Blank

5. *Bacillus subtilis* 10% 환원 탈지유 배양 후 pH 4.6으로 조정 - centrifugeation - filtering(whatman No. 542)의 supernatant
9. *Candida*
13. *Candida* + *Lactobacillus bulgaricus*
17. *Streptococcus thermophilus*
21. *Lactobacillus bulgaricus*
25. *Str.thermophilus* + *Lb. bulgaricus*
29. *Bifidocacillus acidophilus*
33. *Lactobacillus acidophilus*
37. *Lb. Casei*
41. *Lb. helveticus*
45. *Lb. rhamnosus*





a)



b)

Fig 65. pH 4.6 균주 분획물의 PCA

a) 균주 ; 21. *Lactobacillus bulgaricus*, 13. *Candida* + *Lactobacillus bulgaricus*, 41. *Lb. helveticus*, 5. *Bacillus subtilis*, 29. *Bifidocacillus acidophilus*, 25. *Str.thermophilus* + *Lb. bulgaricus*

b) 균주 ; 17. *Streptococcus thermophilus*, 9. *Candida*, 45. *Lb. rhamnosus*, 33. *Lactobacillus acidophilus*, 37. *Lb. Casei*

pH 4.6 soluble nitrogen 분획물인 각 균주에 있어서, 유단백에 대한 알러젠성을 감소시키는 균주는 Fig 65에 나타나 있다.

Control에 대해서 각각의 균주 분획물에서 41번인 *Lb. helveticus*, 29번인 *Bifidocacillus acidophilus*, 17번인 *Streptococcus thermophilus*에서 알레르기를 감소시키지 못하였으며(Fig 64(a))33번 균주인 *Lactobacillus acidophilus*, 37번인 *Lb. Casei*와 9번인 *Candida*에서는 이 분획물에서는 알레르기를 억제시키지 못하였다.(Fig 65(b)).

그 외 균주 분획물에서 알레르기를 감소시키는 것으로 보인다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 달성도

연구 착안점	달성도										기여도
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 32종 항원과 항체제조</li> <li>○ Tolergen의 제조</li> <li>○ PCA, shock score 정립</li> </ul>											
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식육단백질의 알러젠성 평가</li> <li>○ 우유단백질의 알러젠성 평가</li> <li>○ 低 알레르기공정 도출</li> <li>○ 잔여알레르기정량</li> </ul>											
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 환자혈청을 이용한 저알레르기평가</li> <li>○ 진단용알러젠의조제</li> <li>○ 홍보자료</li> </ul>											

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- ① 국내외 홍보
- ② 국내외 특허출원은 하나 국가기업이나 농(축)협에서 원하면 조건 없이 기술이전(일부 특허 출원, 예; allergen 정제 공정, 완제품 공정)
- ③ 국내외 학술지 발표
- ④ 홍보자료의 제작

### 주요내용

- 豚, 鷄의 알레르기성이 牛肉에 비해 強하지 않다.
- 알레르기가 있어도 部位 별로 달라 먹을 수 있는 부위가 있다.
- 알레르기가 있어도 低알레르기 축산물을 먹어도 된다.
- 환자식, 이유식, 조제분유는 반드시 低알레르기 축산물로 만들어야 한다.
- 不耐症 이 아닌 알레르기(항체반응)반응이 있을 때 한약이나 hisamine 효과가 있는 약을 반드시 복용을 금한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

없음

## 제 7 장 참고문헌

Arai, Kyomi

Shaped rice products preparation.

1993

Awade A.C at.al.

Two-step Chromatographic procedure for purification of hen egg white  
Ovomucin, lysozyme, Ovotransferrin and Ovalbumin and characterization of  
purified proteins.

Journal of Chromatography A 1994.

Baron R., Mastail. M Vallet J.L., Luukomska.E

Tecturation of fish pulp by extrusion at low temperature.

Sciences des Aliments 1996 19(1)

Bertak, J.K Karahadian C

Surimi-based imitation crab characteristics affected by heating method and  
end point temperature.

Journal of Food Science 1995 60(2)

Bernhisel-Broadbent J.

Allergenic cross-reactivity of foods and characterization of food allergens  
and extracts.

Annals of allergy, Asthma & immunology. 1995. 75:295-303

Bernhisel-Broadbent J, Strause D. Sampson H. A.

Fish hypersensitivity. II; Clinical relevance of altered fish allergenicity caused  
by various preparation methods.

J. allergy clin immunol. 1992. 90(4):622-629.

Bisson. J.P.,Prella G.,

Process for manufacture of a texturing agent for dairy products.

European Patent Application 1996

Boyle, Elizabeth

Physical, Chemical and nutritional changes of egg yolk on freezing and egg  
food Science 1993 58(2)

Cahen Y. D, Fritsch R, Wuthrich B.

Food allergy with monovalent sensitivity to poultry mat

Clinical and experimental allergy. 1998. 28;1026-1030.

Chronakis,I.S.

Network formation and viscoelastic properties of commercialsoy protein  
dispersion : effect of heat treatment, pH and calcium ions.

Food Research International 1996 29(2)

D'Angelo G, Angeletti C, Catassi C, Coppa G. V.

Probiotic in childhood

Minerva-Pediatr. 1998. 50(5); 163-173.

Dean T. P, Clarke M. C. A, Hourihane J. OB, Dean K. R, Warner J. O

Application of an electrophoretic methodology for the identification of low  
molecular weight proteins in foods.

Pediatric allergy and immunology. 1996. 7; 171-175

DE La BOURDONNAY A.(1974)

Le lactosérum.Un aliment pour qui ? Valeur alimentaireet avenir d'un  
sous-produit.

revue laitière française,323,541

Embola.E.M.,Bokanga. M.

Biochemical indicators of cassava cooking quality.

IFT Annual Meeting 1995.

Gonzalez L.M, Gonzalez-lara R

Solid-phase extraction of soluble proteins in grape musts.  
Chromatogr 1993 655(2)

Gould G. W.  
Biodeterioration of foods and an overview of preservation in the food and dairy industries.  
International biodeterioration and biodegradation. 1996. 267-277

Gaby A. R.  
The role of hidden food allergy/intolerance in chronic disease.  
Altern-Med Rev. 19983(2);90-100.

Guerin C., Brule G  
Separation of three proteins from egg white.  
Sci.Aliments 1992 12(4)

Halken S, Jacobsen H. P, Host A, Holmenlund D.  
The effect of hypo-allergic formulas in infants at risk of allergic disease.  
Eur. J. Clin. Nutr. 1995. 49(suppl 1) S77-S83.

Handel G.A., Jonovic J.A.  
Food loaf shaping texturing rack.  
United States Patent 1996

Hefle S. L, Helm R. M, Wesley Burks A, Bus R. K.  
Comparison of commercial peanut skin test extracts.  
J. allergy clin immunol. 1995. 95:837-842.

Hsieh, Regenstein, Joe M  
Gel point of whey and egg proteins using dynamic rheological data.  
Food Science 1993 58(1)

Huijbers G. B, Colen Ann A. M, Niestijl Jansen Jeannette J, Kardinaal Alwine F. M, Vlieg-Boerstra Berber J. Martens Ben P. M.  
Masking foods for food challenge: Practical aspects of masking foods for a

double-blind, placebo-controlled food challenge.

Journal of the American Dietetic Association. 1994. 94(6).

Jankovsky, M., Staszkoval, I. and Holub J., 1997.

Lysozyme an interesting protein.

Potravin Vedy 15(4):pp297-306

Kanaya, Haruichi

Density variation heat-induced and pressure-treated egg white during gel-to-glass-like transition.

Jpn. J. Appl. Phys Part 1. 1992

Kaputo, M.T.

The role of ashes and sodium bicarbonate in a simulated meat product from chikanda tuber.

Food Chemistry 1996 55(2)

Kawasaki, K., Funatsu, Y., Ito, Y.

Texturization with frozen surimi and sardine lipid by high pressure treatment.

Journal of Japanese Society of Food Science and Technology 1996 43(2)

Kirjavainen P. V., Apostolou E., Salminen S. J., Isolauri E.

New aspects of probiotics - a novel approach in the management of food allergy.

Allergy. 1999, 54:909-915.

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4

Nature. p227

Lee Bou Oung (1979)

Etat de l'état proteines de fromage affiné et de fromage fondu.

Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Nancy-1, Nancy, France

Lee Bou Oung(1981)

Etude biochimique de la fonte des fromages

Thèse de Doctorat d'état es Sciences Université de Nancy-1,Nancy,France.

Lee,Bou Oung.

Etude biochimique de la fonte des fromages, service de Biochimie Appliquée,Université de Nancy-1,thèse doctorat d'état es Sciences Nancy France 1981

Lee,B.O.,Choi,S.H and Chang,O.K.:Quantitative determination for inhibition of allergenicity in medicinal plants by via of passive cutaneous anaphylaxis. The 5th West Pacific Allergy Symposium 223(1997)

Lee B.O,Choi.S.H,Chang. W.K.Park. S.O., and Jeong E.J.

quantitative determination for inhibition of allergenicity in medicinal plants by via of passive cutaneous anaphylaxis  
the 5th West Pacific Allergy Symposium(1997)

Lehrer S. B, Elliott Horner W, Reese G.

Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology.

Critical Review in food science and nutrition. 1996. 36(6); 553-564.

Linden G (1971)

Application de la spectrophotométrie alimentaires.

Ind.Alim.Agri,88,793

Lothar R et.al

Scale-up of Purification of Proteins from egg White by ion-exchange Chromatography.

Chemistry Today's.May/June 1996

Luping Ling

Texturization of soy proteins via twin-screw extrusion.

Dissertation Abstracts International 1993 B 54



Majamaa H, Isolauri E.

Probiotics : A novel approach in the management of food allergy.

J. allergy clin immunol. 1997. 99(2);179-185.

Malakhova.Valentina.P

Preparation of pasteurized egg whites high in lysozyme.

1992

Martinez.R.M.,Ball.H.R.

Effect of ultrapasteurization with and without homogenization on the electrophoretic patterns of aseptically processed liquid whole egg.

Poultry Science 1994 73(2)

Morasch, A.K.

Method of improving the firmness of fish tissue.

United States Patent 1996

Nelsen P.M.,Knap I.H.

A Method for improving the solubility of vegetable proteins.

PCT International Patent Application

Noriuchi, Yoshihiko

Manufacture of Meat Patties with emulsion curd.

1994

Niemeijer N. R, de Monchy D. G. R, Meijer G. H, van Hove W, Dijkstra T.

J, Kauffman H. F, Poulsen L. K, Bindslev-Jensen C, Lowenstein H.

Optimization, standardization and control of food allergens.

monogr allergy. basel, karger. 1996. 32:50-56.

Nilsson C, Oman H, Gallden G, Lundberg M, Harfast B.

A case of allergy to cow's milk hydrolysate.

Allergy. 1999.54; 1322-1326.

O'Neill.E., Mulvihill.D.M

Molecular forces involved in the formation and stabilization of heat-induced

actomysin gels.

Food Chemistry 1994 36(3)

Ortolani C, Ispano M, ansaloni R, Rotondo F, Incorvaia C, Pastorello E. A

Diagnostic problems due to cross reations in food allergy.

Allergy. 1998(supple 46) 53; 58-61.

Park.H.K.,Han.S.k

Chracteristics of broiler meat processing II.Biological properties of myosin B from broiler thigh and breast muscle.

1993 35(3)

Plebani A, Restani A, Naselli C, Galli L, Meiti A, Cavagni G, Ugazio A. G, Poiesi C.

Monoclonal and polyclonal antibodies against casein components of cow milk for evaluation of residual antigenic activity in 'hypoallergenic' infant formulas

Clinical and experimental allergy. 1997. 27;949-956.

Ruyter.P.W.,Almev.N.,Slanik.J.,Teich.W.W

process and apparatus for making meat analogs.

United states Patent 1996

Quirce S, Diez-Gomez M. L, Eiras P, Cuevas M, Baz G, Losada E.

Inhalant allergy to egg yolk and egg white proteins.

Clinical and experimental allergy. 1998. 28;478-485.

Saarinen U. M, Kajosaari M.

Does diet elimination in infancy preven or only postpone a food allergy?

The lancet 1980.166-167.

Sakaguchi M, Nakayama T, Inouye S.

Food allergy to gelatin in children with systemic immediate-type reactions, including anaphylaxis, to vaccines.

J. allergy clin immunol. 1996. 98(6) ; 1058-1061

Serres R, Annariglios, et Petransienne D(1973) Contrôle de la qualité des produits laitiers; tome I Analyse Chimique et physique, tome II, Analyse microbiologique et sensorielle. Direction des Services Vétérinaires, Ministère de l'Agriculture ; Fmprimerie, Commerciale(Douai)

Sheehan D.C. and Ravchak B.B.H(1980) Theory and Practice of histotechnology, Mosby, C, V, Co, USA.

Shimizu, Hideki  
Preparation of marbled ham.  
Jpn. Kokai Tokkyo Koho 1992

Spuergin P, Walter M, Schiltz E, Deichmann K, Forster J, Mueller H  
Allergenicity of  $\alpha$ -caseins from cow, sheep, and goat, Allergy. 1997 52  
293-298.

Stanley, David.W  
Solubility of Beef and Chicken Myofibrillar Proteins in Low Strength Media.  
Agricultural Food Chemistry 1995 42(4)

Strus M.  
The significance of lactic acid bacteria in treatment and prophylaxis of digestive tract disorders.  
Poster. Hig. Med. Dosw. 1997. 51(6); 605-619.

Sutas Y, Soppi E, Korhonen H, Syvaioja E. L, Saxelin M, Rokka T, Isolauri E.  
Suppression of lymphocyte proliferation in vitro by bovine caseins hydrolyzed with Lactobacillus casei GG-derived enzymes.  
J. Allergy Clin Immunol. 1996. 98(1); 216-224.

Tani, Fumito  
Heat-induced transparent gel from hen egg lysozyme by a two-step heating method.

Biocemistry 1993 57(2)

Taylor S. L, Hefle S. L.

Food science perspective on food allergy.

Allergy. 1998. 53:5-7.

Thiebaud.M.,Dumay.E.

Biochemical chacteristics of the protein constituents of crab analogs prepared by extrusion cooking.

Sciences des Aliments 1995 15(1)

Thou kaing sring(1979)

Recherche sur la formation de produits moussants par hydrolys menage des proteines lactogerigues hèse de Docteur Ingenieur, Université de

Nancy-1,Narcy. France

Truong.V.D., Walter.W.J.,Gieesbrecht F.G.

Texturization of sweet potato puree with alginate optiminization by response surface methodology.

IFT Annual Meeting 1995

Varjonen E, Bjorksten F, Savolainen J

Stability of careal allergens

Clinical and experimental allergy. 1996. 26:436-443.

Wanasundara,P.K.Shahidi, F

Optimization of hexametaphosphate-assisted extraction of flazseed proteins using response surface methodology.

Journal of Food Science 1996 6(3)

Wantke F, Proud D, Siekierski E, H\Kagey Sobotka A.

Daily variations of serum diamine oxidase and theinfluence of H1 and H2 blockers: a criticl approach to routine diamine oxidase assessment.

Inflamm-Res. 1998. 47(10);396-400.

Wolfe S. P.

Prevention programmes—a dietetic minefield.

European journal of clinical nutrition. 1995. 49(suppl1). S92–S99.

Xue,Y.,Wang,Z.and Yu,F(1997)

Extraction of lysozyme from eggshell.

Qingdao Daxue Xuebao.Gongcheng Jishuban. 12(2) pp29–36

Yadrick K, Sneeds J.

Nutrition services for children with developmental disabilities and chronic illnesses in education programs.

J. Am. Diet Assoc. 1994. 94(10);1122–1128.

Yamanaka H, Shimakura K, Kikuchi T, Okuzumi M

Occurrence of allergy-like food poisoning caused by 'mirin'-seasoned meat of dorado(*Coryphaena hippurus*).

J. the food hygienic society of Japan. 1987. 28(5); 354–358.

박형기.食肉의 科學과 利用.1998.

이부웅.낙농식품가공학.1991

장건행.식품의 기호성과 관능검사.1975.

정은자,이부웅.우유와 달걀 단백질이 allergenicity에 관한 연구.1992