

## 육제품에 첨가된 대두단백 정량을 위한 면역분석법 개발에 관한 연구 : 대두단백 정량을 위한 항체생산 및 특성조사

김천제 · 김종배 · 김병철\* · 이승배\*\* · 정성원 · 신현길 · 고원식  
건국대학교 축산가공학과, \*고려대학교 축산학과, \*\*상지대학교 낙농학과

### Development of Immunoassay Systems for the Assay of Soy Protein in Meat Products; Antibody Production and Properties for the Assay of Soy Protein

Cheon-Jei Kim, Jong-Bae Kim, Byung-Cheol Kim\*, Seoung-Bae Lee\*\*,  
Sung-Won Jung, Hyun-Kil Shin and Won-Sick Ko

*Department of Animal Products Science, Kon-Kuk University*

*\*Department of Agriculture Science, Korea University*

*\*\*Department of Dairy Science, Sang Ji University*

#### Abstract

This study was carried out to develop a practical enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the determination of soy protein in processed meat products as a preliminary study. The titer of antiserum raised in rabbit by injection of SDS-treated whole buffer extract(WBE) from isolates soy protein(ISP) was above 1:10,000 in indirect ELISA. When the SDS concentration was higher than 0.03% the antibody-antigen reaction was inhibited significantly. However, the antibody-antigen reaction inhibition was not observed when the SDS concentration was less than 0.02%. The antibodies used in this experiment also reacted with renatured antigen after removing SDS by dialysis, though not better than with SDS-denatured antigen(immunogen). The calibration curve with 100 µg/100 ml of sensitivity was obtained in indirect competitive ELISA.

Key words: SDS-PAGE, WBE fraction, indirect ELISA, HRP, antiserum, goat anti-rabbit IgG, immunoassay, soy protein, effect of SDS

#### 서 론

식품공업에 있어서 증량제 및 결합제로서 카제인, 대두단백질, 글로블린, 난백 등 이종단백질의 사용이 증가하고 있으며 특히 육가공품에 첨가되는 카제인과 대두단백질은 그 사용량이 매우 많다. 육가공품에 첨가되는 대두단백질은 Glycinin(11s globulin)과  $\beta$ -conglycinin(7s globulin)이라는 두 종류의 주요 단백질이 전체 단백질의 약 70%를 차지하고 있으며<sup>(1,2)</sup>, glycinin의 분자량은 360,000,  $\beta$ -conglycinin의 분자량은 150,000으로 알려져 있다<sup>(3-5)</sup>. Glycinin은 산성 subunits(분자량 37,000~42,000)와 염기성 subunits(분자량 17,000~20,000)의 두 종류, 12개의 subunits로 구성되어 있고,  $\beta$ -conglycinin은  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ 의 3개의 subunits로 구성되어 있으며, 이들 subunits는 여러가지 처리조건에 의하여 분리 및 재결합하여 gel을 형성한다<sup>(6-8)</sup>. 대두단백질의 가열처리에 의한

gel화의 성질을 이용하여 육가공품의 제조시에 결합제로서 또는 증량제나 보수력의 증가를 위한 첨가제로서 많이 사용하고 있는데, 그 사용이 증가할 경우 저가의 이종단백질을 육단백질과 대체하여 사용함으로써 육제품의 맛과 질을 저하시키며 소비자에게 경제적인 불이익을 야기시킬 우려가 있으므로 대두단백질과 같은 비육단백질의 사용에 관한 규제가 필요하게 되었다. 그러나 식품이나 육제품에서 비육단백질을 정량하는 것, 특히 대두단백질의 경우 대두단백질의 제조 조건이 일정하지 않고, 또 사용되는 대두단백질의 종류나 형태도 다양하여 육제품내에서의 정량에 상당한 어려움이 있다<sup>(1,9-11)</sup>. 지금까지 육제품내에서 대두단백질을 정량하기 위하여 사용된 방법으로는 전기영동법<sup>(12-15)</sup>, indirect 법을 이용한 면역분석법(immunoassay)<sup>(9,16-19)</sup>과 immunoblotting<sup>(20,21)</sup> 그리고 peptide analysis<sup>(5)</sup> 등의 방법이 소개되었으며, 이중 전기영동법과 면역분석법이 가장 많이 사용되어져 왔다. 특히 정확성 및 간편성 등에 있어서 항원-항체반응의 원리에 의한 면역분석법이 가장 효과적임이 입증되어 이에 관한 연구가 집중되고 있다. 현재, 우리나라에서도 육제품의 수요가 증가함에 따라 육제품의 규격화

Corresponding author: Cheon-jei Kim, Department of Animal Products Science, Kon-Kuk University, Mojin-dong, Seongdong-Gu, Seoul 133-701, Korea

내지는 표준화를 위하여 이와 같은 비육단백질의 정량을 위한 방법 개발이 필요하게 되었다. 그러나 아직 면역 분석법에 의한 시도가 국내에서는 전혀 이루어진 바가 없을 뿐만 아니라, 현재 사용하고 있는 면역분석법도 아직 해결해야 할 문제점이 있어 체계적인 연구가 절실히 요구되고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 대두단백질의 정량을 위한 면역분석법 개발을 위하여 대두단백질을 사용하여 항체생산, 면역성 및 반응성 조사, 반응성에 영향을 미치는 요인 조사 등 대두단백질 정량을 위한 기초연구를 실시하였다.

**재료 및 방법**

**재료**

Isolated soy protein(ISP, PP-590)은 천양교역에서 구입하였다. Freund's complete 및 incomplete adjuvant (Sigma, USA)를 항원의 면역시 사용하였고, Goat anti-Rabbit IgG-HRP(Biomakor, Israel), immunotiter plate (Nunc, Denmark), OPD(O-phenylenediamine, Sigma, USA), Minireader II(Dynatech Laboratories, Inc., USA)를 면역분석법의 개발을 위해 사용하였고 추출용 시약으로 sodium dodecyl sulphate(SDS, Sigma, USA)와 2-mercaptoethanol(2-ME)을 사용하였으며 항혈청의 생산을 위해 백색종 토끼를 사용하였다.

**방법**

대두단백질 globulin의 분리

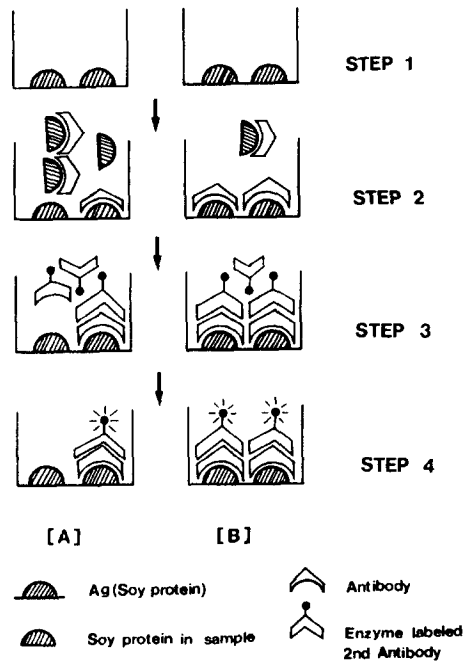
100g의 ISP를 2l의 0.03 M Tris-HCl(pH 8.0, 10 mM 2-ME, at 20°C)에 녹인 후 원심분리(15,000 rpm 20 min, at 20°C)하여 WBE(whole buffer extract)를 만들었다.

항혈청의 생산

Ravestain 등<sup>(17)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였는데, ISP로부터 분리한 WBE 분획을 6 mg/ml의 농도로 0.38% (w/v) SDS와 0.02%(v/v) 2-ME를 함유한 PBS(0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.75 M NaCl, pH 7.2)에 녹여 100°C에서 3분간 가열한 후 Freund's complete adjuvant와 1 : 1로 섞어 토끼의 등에 1ml 피하주사하였다. Booster는 incomplete adjuvant를 사용하여 같은 방법으로 2주 간격 2회 주사하였다. 항체의 역가가 높아지면 심장으로부터 체혈하여 항혈청을 분리하였으며, 0.02% (w/v) sodium azide를 첨가하여 -70°C에서 보관 사용하였다.

대두단백질의 정량을 위한 ELISA 과정

ELISA 방법은 항원을 coating한 indirect competitive 방법으로 Fig. 1에 나타난 바 대로 실시하였으며, 중요 사항을 요약하면 다음과 같다. 일정농도의 항원(1.75 µg/ml)을 coating buffer(0.05 M sodium carbonate buffer, pH 9.6)에 녹여 0.2 ml씩 immunotiter plate에 분주하여 4°C에서 overnight 반응시킴으로서 coating시켰다. Plate에 coating 되지 못한 항원을 washing buffer(0.05



**Fig. 1. Schematic presentation of indirect competitive ELISA method for soy protein**

M PBS, 0.05% Tween 20) 0.2 ml로 3회 세척하고, 3% bovine serum albumin(BSA)으로 blocking시켰다(Step 1). 여기에 항체 0.1 ml과 항원 또는 시료 0.1 ml를 첨가한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다(Step 2). 반응이 끝난 후 immunotiter plate를 다시 3회 세척하고, Goat anti-Rabbit IgG-HRP conjugate용액(1 : 30,000 dilution in PBS)을 첨가하여, 37°C에서 2시간 첨가반응시켰다(Step 3). 다시 immunotiter plate를 세척하고, 효소 HRP(horse-radish peroxidase)의 기질인 OPD용액(OPD 40 mg, DW 50 ml, 0.1 M citric 24.3 ml, 0.2 M sodium phosphate dibasic 25.7 ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 ml, pH 5, 0)을 넣고 37°C에서 30분 반응시킨 후, 반응정지용액인 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50 µl씩 넣고 490 nm에서 O.D값을 읽었다(Step 4). Fig. 1의 [A]는 Step 2에서 항체와 함께 첨가되는 유리(free) 항원이 많아 coating된 항원과 경쟁적으로 항원-항체 결합을 하여 coating 항원이 항체와 결합하는 것을 방해하므로 낮은 O.D값을 나타내는 경우이며, [B]는 유리 항원의 양이 적어 coating 항원과의 경쟁반응을 적게 일으켜 높은 O.D값을 나타내는 경우를 표시한 것이다.

**결과 및 고찰**

대두단백질에 대한 항체의 생산과 그 역가

대두단백질의 WBE 분획으로 면역시킨 토끼로부터 생산된 항혈청의 항체역가(titer)를 조사하고자 indirect non-competitive ELISA에 의한 항체 희석곡선을 작성

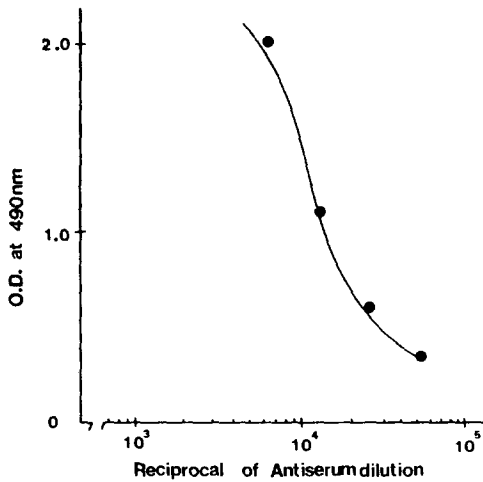


Fig. 2. Titration curve of antiserum against whole buffer extract(WBE) from ISP

하였던 바 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 그림에 나타난 바와 같이  $6 \times 10^3$  배 이상으로 항혈청의 희석치가 커짐에 따라 반응 정도가 낮아졌으며, 항체의 역가는 약  $10^5$  이었다.

**SDS의 농도가 항원-항체 반응에 미치는 영향**

시료내의 대두단백질의 추출과정에서 anionic detergent인 SDS를 첨가하는데, SDS는 항원-항체 반응을 제어한다는 연구사례<sup>(23)</sup>가 있어 본 연구에서도 SDS가 항원-항체 반응을 어떻게 제어하는가를 조사하기 위하여 SDS 농도를 0.5%로부터 2배 희석법으로 연속적으로 희석하여 coating된 항원이 항체와 반응함에 있어 SDS가 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 SDS 농도가 0.03% 이상에서는 그 영향이 매우 심하였고, 특히 SDS 농도 0.1% 이상에서는 0%에 비하여 반응성이 20% 이하로 낮아져 거의 반응을 하지 않았다. 그러나 0.02% 이하에서는 반응에 거의 영향을 미치지 않았다. 이와 같은 결과는 Dimitriadis<sup>(23)</sup>의 결과와 일치하였다. 따라서 SDS를 추출용시약으로 사용할 때에는 최종농도가 0.02% 이상이 되어서는 안된다고 사료되며<sup>(24,25)</sup>, 특히 항원-항체 반응에 근거한 면역분석법에 있어서 반드시 고려되어야할 중요한 사항이라고 생각된다.

**변성 및 재생 대두단백질의 항원-항체 반응성**

본 실험에 사용된 항체는 SDS 처리에 의하여 변성된 대두단백질을 면역항원으로 하여 생산된 것이다. 만약 이 항체가 변성되지 않은 대두단백질이나 SDS로 변성시킨 후 SDS를 제거함으로써 재생(renaturation)된 대두단백질과 전혀 반응을 하지 않거나 반응성 정도의 차가 크다면 육체품내 대두단백질의 정량에 있어서 많은 문제점이 야기될 수 있다<sup>(17)</sup>. 따라서 본 실험에서 사용한

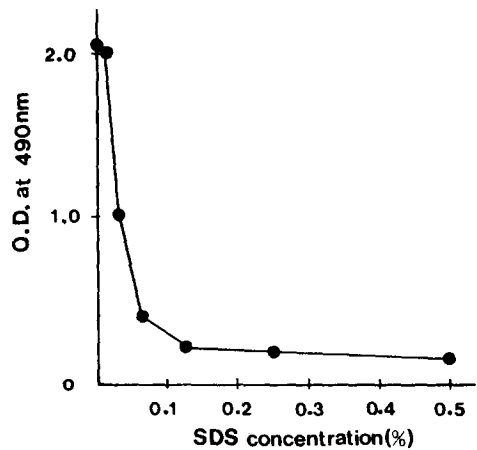


Fig. 3. The effect of SDS on antibody-antigen interaction

항체가 처리과정이 다른 대두단백질과 반응성의 차이가 어떻게 나타나는가를 조사하기 위하여 SDS를 함유하는 변성 대두단백질(ELISA시에 SDS의 최종농도가 0.02% 되게 희석하여 사용)과 투석에 의하여 SDS를 제거한 재생 대두단백질로써 검정곡선(calibration curve)을 작성하였던 바 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 흥미롭게도 SDS를 제거한 재생 항원은 변성 항원보다 약간 낮은 반응을 나타내었다. 이와 같은 결과는 본 실험에 사용된 항체가 SDS 처리를 받은 즉, SDS 변성 대두단백질로서 생산된 것이기 때문에 재생 대두단백질과 반응성이 다르다는 것을 알 수 있다. 만약 SDS를 제거한 재생 대두단백질로 면역시킨 항체라면 정반대의 결과가 나타날 수 있을 것이라고 사료된다. 이와 같은 결과로 미루어 볼때 본 실험에 사용된 항체를 사용할 경우, 시료의 추출과정 중에 SDS가 시료내에 첨가되어 대두단백질이 다소 변성되었다 하더라도 시료의 처리과정에서 SDS를 제거하기 위한 또 다른 과정이 필요하지 않으며, 또한 변성되지 않은 대두단백질이 다소 존재한다 하더라도 그 양이 상대적으로 높지 않다면 분석에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

**대두단백질의 정량을 위한 검정곡선의 작성**

5% SDS를 함유한 PBS에 ISP가 10 mg/ml 농도가 되게 조정된 것을 원액으로 하여 이것으로부터 PBS로 희석하여 최종 SDS 농도가 0.02%가 되게하고, ISP가 100 ml당 3, 1.5, 0.75, 0.38, 0.19, 0.095, 0.0475  $\mu$ g이 되게 하여 검정곡선(calibration curve)을 작성하였을 때 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 그림에 나타난 바와 같이 ISP 농도가 커짐에 따라 반응 정도가 점차 떨어졌으며, 100 ng/100 ml까지 측정할 수 있는 감도(sensitivity)를 나타내었다. 이와 같은 결과는 Hitchcock 등<sup>(18)</sup>이 얻은 감도와 비슷한 결과이나 curve의 standard범위의 폭이

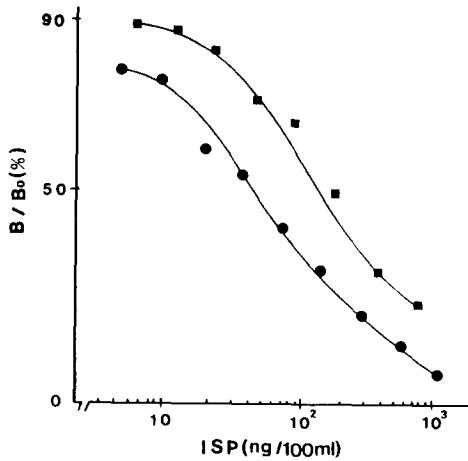


Fig. 4. Comparison of calibration curves of SDS treated soy protein(●) and renatured soy protein by removing SDS(■)

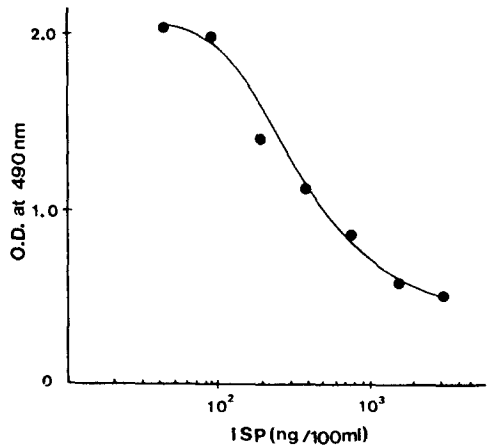


Fig. 5. Calibration curve of indirect competitive ELISA for isolated soy protein

다른 연구자의 것(100 ng~10 µg)보다 더 좁아 시료의 분석을 더 정확히 할 수 있으리라 사료된다. 그러나 본 연구에서 제시된 자료만으로 대두단백질의 분석을 위한 indirect competitive ELISA법의 사용 가능성을 평가하기에는 부족한 점이 많다. 보다 체계적인 엄밀한 연구 검토가 있어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 실험은 가공한 육제품에 첨가된 대두단백질(soy proyein)을 정량하기 위한 면역분석(Immunoassay)법의 개발을 목적으로 실시하였다. Isolated soy protein(ISP)의 whole buffer extract(WBE) 분획을 SDS 처리 후 토끼에 주사하여 생산된 항혈청의 항체역가를 indirect ELISA법으로 조사하였을시 1 : 10,000 이상에서도 반응을 나타내었다. 시료의 처리시 SDS의 최종농도가 0.03% 이상에서는 항원-항체 반응이 심각하게 저지되었으나, 0.02% 이하에서는 거의 영향을 미치지 않았다. 본 실험에 사용한 항체는 SDS로 변성된 항원(대두단백질)은 물론 SDS를 투석으로 제거한 재생항원(renatured antigen) 과도 반응하였으나 그 정도는 변성항원에 비하여 약간 낮았다. 검정곡선(calibration curve)을 indirect competitive ELISA 법으로 작성하였을시 ISP를 100 ng/100 ml 까지 측정할 수 있는 감도(sensintiy)를 얻었다.

감사의 말

본 연구는 1989~1990년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구비 조성에 의하여 수행된 연구결과와의 일부로 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

- Hughes, S.A. and Murphy, P.A.: Varietal influence on the quantity of glycinin in soybeans. *J. Agric. food Chem.*, 31, 376(1983)
- Iwabuchi, S. and Yamauchi, F.: Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 205(1987)
- Moreira, M.A., Hermodson, M.A., Larkins, B.A. and Nielsen, N.C.: Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. *J. Biological Chemistry.*, 254, 9921(1979)
- Moreira, M.A., Mahoney, W.C., Larkins, B.A. and Nielsen, N.C.: Comparison of the antigenic properties of the glycinin polypeptides. *Achives of the Biochemistry and biophysics.*, 210, 643(1981)
- Llewellyn, J.W., Dean, A.C., Sawyer, R., Bailey, F.J. and Hitchcock, C.H.S.: Technical note; the determination of meat and soya proteins in meat products by peptide analysis. *J. Food. Technol.*, 13, 249(1978)
- Nakamura, T., Utsumi, S. and Mori, T.: Interactions during heatinduced gelation in a mixed system of soybean 7s and 11s globulins. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2429(1986)
- Utsumi, S. and Kinsella, J.E.: Structure-function relationships in food proteins: Subunit interactions in heat induced gelation of 7s, 11s and soy isolate proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 297(1985)
- Ishino, K. and Kudo, S.: Relationship between gelatin and aggregation of alkali-treated soybean 7s and 11s globulins. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1029(1979)
- Griffiths, N.M., Billington, M.J., Crimes, A.A. and Hitchcock, C.H.S.: An assessment of commercially available reagents for an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) of soya protein in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 1255(1984)
- Kitamura, K., Toyokawa, Y. and Harada, K.: Polymorphism of glycinin in soybean seeds. *Phytochemistry*, 19, 1841(1980)

11. Murphy, P.A. and Resurreccion, A.P.: Varietal and environmental differences in soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin content. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 911 (1984)
12. Armstrong, D.J., Richert, S.H. and Rieman, S.M.: The denaturation of isolated soybean protein in raw and pasteurized meat products. *J. Food Technol.*, **17**, 327 (1982)
13. Yamagishi, T., Miyakawa, A., Noda, N. and Yamauchi, F.: Isolation and electrophoretic analysis of heat-induced products of mixed soybean 7s and 11s globulins. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1129(1983)
14. Poli, G., Balsari, A., Ponti, W., Cantoni, C. and Mas-saro, L.: Crossover electrophoresis with indirect immunofluorescence in the detection of soy protein in heated meat products. *J. Food Technol.*, **14**, 483(1979)
15. Lei, M.G. and Reek, G.R.: Two dimensional electrophoretic analysis of the proteins of isolated soybean protein bodies and the glycosylation of soybean proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 296(1987)
16. Heitmann, J.: Nachweis von Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen mit einem indirekten Immunfluoreszenztest. *Fleischwirtschaft*, **67**, 621(1987)
17. Ravestain, P. and Driedonks, R.A.: Quantitative immunoassay for soya protein in raw and sterilized meat products. *J. Food Technol.*, **21**, 19(1986)
18. Hitchcock, C.S.H., Bailey, F.J., Crimes, A.A., Dean, D.A. and Davis, P.J.: Determination of soya proteins in food using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 157(1981)
19. Iwabuchi, S. and Yamauchi, F.: Determination of glycinin and  $\beta$ -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 200(1987)
20. Heinert, H.H. and Baumann, H.J.: Nachweise von erhitztem Soja Protein in Bruhwurst durch Elektro Immunoblotting(Glycoprotein-Blotting). *Fleischwirtschaft*, **66**, 581(1986)
21. Janssen, F.W., Voortman, G. and de Baaij, J.A.: Schnellnachweis von Sojaiwei  $\beta$ , Caseinat, Molkenwei  $\beta$ , Ovalbumin und Weizengluten in warmebehandelten Fleischerzeugnissen mittels dot blotting. *Fleischwirtschaft*, **67**, 611(1987)
22. Thanh, V.H. and Shibasaki, K.: Major protein of soybean seed. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1117(1976)
23. Dimitriadis, G.J.: Effect of detergents on antibody-antigen interaction. *Analytical Biochemistry*, **98**, 445(1979)
24. Patterson, J.M., Kortylewies, Z. and Smith, Jr. W.T.: Thermal degradation of sodium dodecyl sulfate. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 782(1984)
25. Suresh chandra, B.R., Appu Rao, A.G. and Narasinga Rao, M.S.: Effect of temperature on the conformation of soybean galycinin in 8M urea or 6M guanidine hydrochloride solution. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1402 (1984)

---

(1992년 1월 7일 접수)