KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 32, No. 5, pp. 991~996(2000)

식품 중 대두단백질의 정량분석을 위한 효소면역측정법

손동화 · 김현정 · 음병욱 · 김수호 · 김순미*
한국식품개발연구원, *가천길대학 식품영양학과

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitation of Soy Proteins in Food

Dong-Hwa Shon, Hyun-Jung Kim, Byong-Wook Eum,
Soo-Ho Kim and Soon-Mi Kim
Korea Food Reserch Institute,
**Department of Food & Nutrition, Gachon Gil Colleage*

Abstract

Enzyme-linked immunosorbent assay was developed for the analysis of soy protein in foods. Competitive indirect ELISA (ciELISA) was established by using specific antibodies against the heat-stable acidic subunits (AS) of glycinin. Soy proteins in each sample used in this study were solublized in the presence of urea and DTT and boiled at 100℃ for 1hr and then were renatured with a cystine-containing solution. After these treatments, each isolated soy protein (ISP) heated at 60, 70, 80, 90℃ for 10 minutes showed almost the same curve as unheated one in the ciELISA. The detection limit of ISP was 0.3 μg/mL. Anti-AS antibodies have very low reactivities less than 0.1% toward non-meat proteins such as skim milk and casein and did not show any reactivities toward egg white powder and ovalbumin. When laboratory-made sausages containing ISP of 0.5~3% were assayed by ciELISA, the mean recovery was about 83% (C.V., 19%). In addition, the average content of soy protein in commercial sausages was 1.27%.

Key words : anti-soy protein antibodies, isolated soy protein (ISP), sausage, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

서 론

대두단백질은 육 가공제품의 생산시 제품의 함수력과 함지력의 증가, 조직감 향상, 결착력 증진의 목적으로 이용된다. 육 단백질에 비해 가격이 훨씬 저렴한 식물성 단백질이 육 가공제품에 육의 대체물로 첨가되기도 하는데, 이 때문에 대두단백질이 식품규정에 적합한 정도로 첨가되었는지를 확인할 수 있는 검출법의 개발이 요구되고 있다[1].

다양한 분석기법이 대두단백의 분석에 적용되어 왔는데, 그 중 현미경을 이용한 방법은 대두단백이 대두분말이나 인공육의 식물세포형태로 첨가되는 경우에만 활용가능 하고[2], 전기영동과 펩타이드 분석법은 결과의 정확성이 높으나 시간과 비용이 많이 소요되며 숙련된 기술이 요구되는 단점이 있다[3]. 반면에, 면역학적 방법인 효소면역측정법(ELISA)은 신속하고 정확한 방법으로 보고되고 있다[4].

대두단백질은 일반적으로 가열처리에 의해서 주요한 단백질이 불용화 되는데 이는 glycinin의 basic subunit과 β-conglycinin의 결합으로 발생된다[5]. 열처리로 인한 단백질의 응집은 육 가공식품내의 대두단백질 분석에 장애를 주는 큰 요인이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 단백질의 구조변화를 유도하는 SDS와 urea의 처리와 단백질의 환원제로 사용되는 2-mercapto-ethanol(2-ME)와 DTT를 이용한 분석방법 등이 개발되어 왔다[4,6]. 또한, 전처리를 통한 시료 단백질의 가용화 후에도 효소면역측정법을 이용한 분석을 위해서는 용매의 교환이 필요한데 이를 위해서 투석이나 희석의 방법이 이용되고있다. Hitchicok 등[4]은 0-7%까지 대두분말을 첨가하여 제조한 소세지 중의 대두 단백질의 분석을 실시하였고 회수율 70%의 결과를 보였

Corresponding author : Dong-Hwa Shon, Korea Food Reserch Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-Si, Kyunggi-do 463-746, Korea
Tel : 82-31-780-9133
Fax : 82-31-709-9876
E-mail : dhs95@kfri.re.kr

다. Rittenburg 등[6]은 ISP를 소세지에 첨가하여 spike test를 실시하여 92%의 양호한 회수율를 보고하였고 김 등[7]은 대두단백을 첨가한 소세지를 제조하여 대두단백의 회수율을 조사한 결과 79.1-106.3%로 나타났다.

본 연구에서는 전보에 명기된 바와 같이 생산한 항 AS 항체를 이용하여 개발된 간접경합 ELISA 방법[8]으로 ISP의 열처리에 따른 항체의 반응성의 변화, 비육류 단백질과의 항체의 반응성을 조사하였다. 또한 ISP의 첨가량을 달리한 소세지를 제조하여 ISP의 회수율의 확인과 시판 육제품에 대한 정량분석을 실시함으로서 육제품 내의 대두단백질 분석을 위한 면역분석법을 개발하였다.

재료 및 방법

재료

대두분말은 오대산자연식품으로부터 구입하였고 분리대두단백은 두솔산업사로 부터 구입한 supro 500E (Protein Technologists International Co., Checkerboard Square, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. Trizma® pre-set crystals, phosphate buffered saline with Tween 20, phosphate-citrate buffer tablet, 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride(TMB), goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하였다. Nunc사(Roskilde Denmark)의 microtiter plate from Maxisorp™(#446612)와 Thermomax™ Molecular Devices사(Sunnyvale, CA U.S.A.)의 microplate reader를 사용하였다. 시판 소세지는 목우촌, 김밥햄, 숯불 구이햄, 훨터치, 순돈육시대, 비엔나소세지와 돈육 또한 시중에서 구입하였다.

시료의 전처리

Cortex에서 제공된 방법[9]에 준하여 대두단백의 분석을 위한 전처리를 실시하였다. 간략히 설명하면, 12 g의 시료를 취한 다음 48 g의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹여 슬러리상태가 되면 균질화시켰다. 이를 2.5 g씩만 취하여 50°C로 가온된 수조에 넣어 온도를 높이고, 여기에 100°C로 가온된 7.5 mL의 urea-DTT 추출 용액을 첨가한 다음 100°C의 수조에서 1시간 동안 열처리하였다. Cystine이 함유된 renaturation용액 20 mL을 시료에 첨가하고 이를 다시 50°C로 온도를 높여 반응시킨 후 총 30 mL이 된 시료를 다시 10 mL씩 3개로 나누어 각각 10 mL의 시료를 10배씩 희석하여 Whatman filter paper No. 1로 여과하여 실험에 사용하였다. 이때 urea-DTT용액은 urea 80 g에 0.25 M Tris-HCl buffer(pH 8.6)을 20 mL과 0.29 g의 DTT를 첨가하고 100 mL까지 증류수를 채워 만들었고 renaturation용액은 1.8 g의 L-cystine에 1 M의 NaOH 20 mL로 L-cystine을 충분히 녹인 다음 3.5 g의 NaCl을 900 mL에 녹인 용액에 L-cystine용액을 첨가하였고 이를 0.1 M HCl을 pH 9.0까지 되게 만들었다.

ISP는 60-90°C까지 온도 변화를 주어 열처리하였고 이를 위의 전처리과정을 거쳐 간접경합 ELISA (ciELISA)로 분석하였다. 또한 ISP에 대한 표준곡선 또한 동일한 방법으로 실험하였다.

간접경합 ELISA(ciELISA)

ISP를 2 μg/mL의 농도로 coating buffer(0.02 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 용해하고 각 well당 100 μL씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. PBST washing buffer(10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4, 0.05% Tween 20) 3회 세척 후 적당 배율로 희석한 항혈청과 단백질 즉, 항원(ISP, 탈지 분유, 카제인, 난백분말, ovalbumin)의 1 : 1 혼합액을 100 μL씩 넣고, 실온에서 1시간 반응시켰다. 이때 사용한 항혈청인 항11S acidic subunit 항체(항AS 항체)는 glycinin의 11S의 acid subunit을 토끼에 면역하여 생산된 것으로 이는 전보에 명기된 바와 같다[8]. Washing buffer로 3회 세척 후, goat anti-rabbit IgG antibody-HRP를 2차 항체로써 1/10,000로 washing buffer에 희석하여 사용한 다음 1시간 처리 후 세척하고 기질용액(0.01% H_2O_2, TMB 0.1 mg/mL in phosphate citrate buffer)을 30분 반응시킨 후 2 M H_2SO_4로 반응을 정지시키고 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

대두단백의 분석회수율 측정

탈지분유에 ISP를 0-5%까지 첨가하여 첨가량에 대한 분석치의 비로 회수율을 확인하였다. 즉, 탈지분유에 ISP의 첨가량을 조절하여 0, 1, 2, 3, 5%가 되도록 첨가하고 ISP가 첨가된 탈지 분유에 PBST buffer로 단백질을 용해하여 ciELISA를 실시하였고 그 결과치로부터 회수율을 구하였다.

ISP의 함량을 달리하여 소세지를 제조하였다. 우선 돼지고기 등심을 구입하여 지방등을 제거하였고 식염과 빙수를 첨가하였다. 난백분말은 ISP와의 량을 조절하여 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 3%로 가하였고 반대로 ISP의 경우 3, 2.5, 2, 1, 0.5, 0%로 첨가하여 6가지 종류의 소세지를 준비하였다. 소세지 제조를 위해 모든 첨가물을 grinder로 간 다음 충진하고 75°C에서 30분간 가

열처리 하였다. 제조된 소세지는 일부를 채취하여 시료처리를 하였고 ciELISA를 통하여 회수율을 조사하였다.

시판시료의 분석

시중에서 구입한 6종의 육가공제품(목우촌, 김밥햄, 숯불 구이햄, 훨터치, 순돈육시대, 비엔나소세지) 중의 ISP 함량을 측정하기 위해 시료를 채취하여 전처리를 실시하였고 ciELISA를 통하여 분석하였다.

결과 및 고찰

전처리조건의 확립 및 분석의 안정성

물에 잘 녹지 않고, 가열 처리시 함유 단백질이 더욱 불용화되는 대두의 성질은 효소면역측정법을 이용하여 대두단백질을 분석할 때 큰 장애요인이 된다. 본 연구에서는 이러한 분석의 문제점을 극복하고자 첫 번째로 대두 단백질 중에서 열에 안정한 glycinin의 11S acidic subunit 만을 분리, 정제한 후 이를 토끼에 면역하여 특이 항체를 생산하였다. 그리고 생산된 항체를 이용하여 가열처리된 대두 단백질을 분석하였으나 검출감도가 현저하게 낮아서(data 생략) 가열처리를 거친 대두 단백질의 분석을 위해서 두 번째로 불용화된 시료의 가용화 과정이 요구되었다. 재료 및 방법에서 명기된 바와 같이 시료를 전처리 하여 ciELISA를 실시한 결과 검출감도가 100배정도 향상됨을 알 수 있었다. 전처리 중 가용화 과정 중에 사용되는 urea는 단백질의 소수성 부분을 노출시켜 random coil의 구조로 변화를 주는 역할을, DTT는 대두 단백질 특히, glycinin의 subunit을 연결하고 있는 S-S결합을 환원시켜 각각의 subunit로 분리하는 역할을 한다. 이때, 단백질의 환원제로 자주 사용되는 2-ME 대신 DTT를 사용한 이유는 DTT가 2-ME에 비해 소량을 첨가하여도 환원정도가 높고 2-ME로 환원되지 않는 단백질도 DTT로 환원됨이 보고되어 있어 효과적이라고 판단하였기 때문이다[10]. 가용화된 시료 중 전처리시 첨가된 시약을 제거하고 단백질을 재생시키기 위하여 보통 투석과정을 거치나 이는 단시간에 많은 수의 시료를 처리하는데 적합하지 못하다고 판단하였다. 따라서 희석의 방법을 선택하였고 방법은 cystine이 함유된 용액으로 단백질의 S-S 결합을 reformation시킴으로써 분석이 용이하게 하였다[6]. 특히, 여기서 사용된 cystine은 두 가지 목적으로 사용되었는데 하나는 시료 중 과량의 DTT를 제거하는 목적으로 나머지 하나는 S-S결합의 재형성에 필수적인 산화조건을 제공하고자 하는 목적이었다.

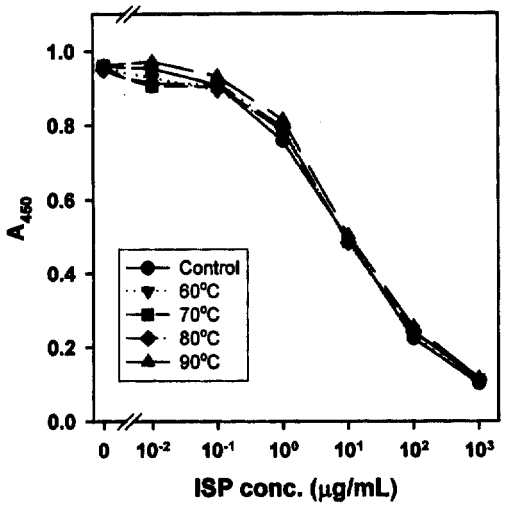

Fig. 1. Heat stability of ISP as determined by ciELISA. ISP(1 mg/mL in PBS) was heated at each temperature for 10 min.

이러한 조건으로 ciELISA의 ISP 분석법에 대한 열안정성을 조사한 결과, 열처리에 따른 ciELISA 표준곡선의 변화가 거의 없음을 확인하였다. 즉, ISP를 60, 70, 80, 90°C까지 열처리하여 본 연구의 전처리방식으로 처리한 다음 항AS 항체를 이용한 ciELISA를 실시하였고 결과는 Fig. 1과 같다. 열처리를 시킨 모든 시료가 열처리 받지 않은 시료(control)와 거의 동일한 곡선을 나타내었고 이는 ISP에 대한 전처리가 아주 효과적임을 확인할 수 있다. 김 등[7]은 돈육에 대두단백을 첨가하여 제조한 돈육혼합물을 추출용액으로 추출한 다음 온도별로 열처리하여 ISP의 회수율을 구하였고 그 결과 75°C에서 30분간 열처리한 시료의 경우 89.6-117.5%으로 보고하였다. 이에 비하여 본 연구에서 실시한 ciELISA는 60-90°C까지의 열처리에도 거의 안정적인 곡선을 보여준 것으로 나타나 분석의 열 안정성 측면에서 더 효과적인 방법이라 할 수 있었다. ISP의 분석을 위한 ciELISA 표준곡선은 Fig. 2의 ISP의 plot과 같으며 검출한계는 0.3 μg/mL으로 나타났다. Rittenburg 등[6]은 ISP가 5-50 μg/mL까지 첨가될 경우 정량이 가능한 것으로 보고하였는데 이에 비해 검출감도가 월등히 민감하다고 할 수 있었다. 따라서, 본 연구의 시료처리 조건으로 ISP는 가공처리 과정에 첨가되는 열처리의 유무에 크게 영향받지 않고 분석이 가능한 것으로 나타났다.

다른 단백질과의 반응성

식품소재로 빈번히 사용되는 여러 종류의 다른 단

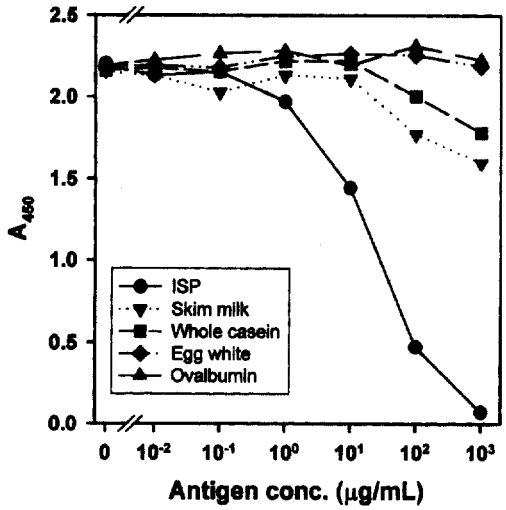

Fig. 2. Reactivities of anti-AS antibodies toward each protein.

백질과의 반응성을 조사하였다. 탈지 분유, 카제인, 난백분말, ovalbumin에 대한 반응성을 ciELISA로 확인한 결과 사용된 단백질에 대한 반응성이 0.1% 이하이거나 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 식품소재로써 ISP가 다른 소재단백질과 혼입되어 사용되었을 경우에도 ISP에 대해 특이적으로 분석할 수 있을 것으로 생각된다. Hichicok 등[4]은 비육류 단백질로써 식품의 소재로 사용되는 대두단백, 우유분말, 계란분말, 밀가루 등에 대한 항대두단백 항체의 반응성을 조사하였다. 그 결과 대두단백에 대한 항체의 반응성을 100%로 볼 때, 우유분말에 대해서 3.6%, 난백분말에 대해서 2.8%, 밀가루에 대해서 1.1%의 반응성을 보였다. 이는 본 연구의 결과와 비교해 볼 때 반응성의 양상은 유사하나 항AS 항체가 더욱 특이적으로 대두단백을 인식하는 것으로 밝혀졌다. 또한 대두단백질 자체를 면역하여 생산된 항체보다 대두단백질 중 glycinin의 acidic subunits의 부분만을 선택적으로 면역하여 생산된 항체를 사용하였기 때문에 다른 식품소재 단백질과의 교차반응이 거의 없이 대두단백질에 대해서만 특이적으로 반응한 것으로 생각된다.

ISP의 회수율 분석 및 시판 시료의 분석

ISP를 분말상 식품인 탈지 분유와 소세지에 첨가한 다음 ciELISA를 통하여 회수율을 조사하였다. 탈지분유에 0.5, 1, 3, 5%의 ISP를 첨가하였을 때 그 분석치는 각각 0.4, 0.68, 2.0, 4.4%로 나타났다(Table 1). 따라서 회수율은 각각 80, 68, 67, 88%였고 평균은 76%로 나타났으며 분산치는 11.5%으로 양호한 회수율을

Table 1. Recovery of ISP in skim milk as assayed by ciELISA[1]

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

[1]Powdered ISP was added to a skim milk powder.
[2]Correction factor converts ppm (μg/mL) to % concentration.
[3]Mean±S.D. (C.V.)

Table 2. Recovery of ISP in laboratory-made sausage as assayed by ciELISA[1]

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

[1]Powdered ISP was added to a laboratory-made sausage.
[2]Correction factor converts ppm (μg/mL) to % concentration.
[3]Mean±S.D. (C.V.)

Table 3. Detection of ISP in commercial food as assayed by ciELISA

Sample	Labelled ISP (%)	Dilution ratio	ELISA value	ISP detected (μg/mL)	Corr. factor[1)]	ISP assayed (%)	Recovery (%)
Sausage-A	None	5/10,000	0.561	5.4	1/5	1.08	
Sausage-B	None	5/10,000	0.575	4.6	1/5	0.92	
Sausage-C	None	5/10,000	0.540	7.2	1/5	1.44	
Sausage-D	None	5/10,000	0.528	8.0	1/5	1.60	
Sausage-E	None	5/10,000	0.562	5.4	1/5	1.08	
Sausage-F	1.73	5/10,000	0.531	7.6	1/5	1.52	88
Average						1.27±0.26	

[1)]Correction factor converts ppm (μg/mL) to % concentration.

보였다.

실험실에서 제조한 소세지의 경우 0.5, 1, 2, 2.5, 3%의 ISP를 첨가하였고 분석치는 각각 0.56, 0.68, 1.60, 1.76, 2.56%로 나타났다. 따라서 회수율은 각각 112, 68, 80, 70, 85%였고 평균 83%로 나타났으며 분산치는 19%로 나타났다(Table 2). 한편, 대두를 첨가하지 않고 제조한 소세지의 분석치가 0.068로 나타났는데 이는 소세지 내에 다른 단백질 성분과 항AS 항체가 비 특이적 반응을 보인 것으로 생각되며 분석시 고려하지 않아도 무리가 없다고 생각된다. Rittenburg 등[6]은 소세지에 ISP를 첨가하여 spike test를 실시한 결과 92%의 회수율를 보였고 이는 소세지에 사용되는 여러 가지 재료가 분석시 방해작용을 하지 않아서 높은 회수율을 보였다고 보고하였다. 한편으로, 김 등[7]은 유화형 소세지를 제조하여 첨가된 대두단백의 회수율을 조사하였고 그 결과 79.1-106.3%로 나타났고 대두단백의 첨가량이 많을수록 대체적으로 회수율이 낮게 나타나는 경향을 보였다고 보고하였다.

시판 소세지 6종의 분석 결과 ISP 평균 함량은 1.27%(S.D., 0.26)로 나타났다(Table 3). 특히, ISP의 함량이 1.73%로 유일하게 표시되어 있는 소세지 F의 경우는 1.52%로 나타나 88%의 회수율을 보였다. 따라서 본 연구에서 개발한 ciELISA는 spike test 및 시료분석의 결과가 양호하여 가공식품 중의 대두단백질 분석에 충분히 적용 가능한 것으로 생각된다.

요 약

식품 중 대두단백질의 분석을 위한 효소면역측정법(ELISA)을 개발하고자 하였다. 대두단백질의 주 구성성분이며 열에 안정한 glycinin의 acidic subunits(AS)에 대한 특이항체를 생산하였고 이를 이용하여 간접경합 ELISA(ciELISA)를 확립하였다. 시료처리조건은 urea와 DTT로 처리함으로써 용해시킨 다음 100°C에서 1시간 열처리하였고 cystine을 함유한 용액으로 재생시켰다. 이러한 시료의 처리조건하에서 ISP를 60-90°C까지 열처리한 시료에 대해서도 분석결과의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 표준곡선 상에서 ISP의 검출한계는 0.3 μg/mL이었다. 항AS 항체의 다른 단백질에 대한 반응성을 검토한 결과, 탈지분유, 카제인, 난백분말, ovalbumin에서 0.1%이하로 미약하게 반응하거나 거의 반응하지 않는 것으로 나타났다. ISP를 0.5-2%첨가한 탈지분유에 대한 ISP 분석 회수율은 평균 76%(C.V., 11.5%)였으며 ISP를 0.5-3% 첨가하여 시험제조한 소세지의 경우 평균 83%(C.V., 19%)로 나타났고 시판 소세지 6점에 함유된 ISP의 함량은 평균 1.27%로 나타났다.

문 헌

1. Nakamura, T., Utsumi, S. and Mori, T. Formation of pseudoglycinins form intermediary subunits of glycinin and their gel properties and network structure. Agric. Biol. Chem. 49: 2733-2740 (1985)
2. Flint, F.O. and Meech, M.V. Quantitative determination of texturised soya protein by a stereological technique. Analyst. 103: 252-258 (1978)
3. Bailey, F.J. A novel approach to the determination of soya proteins in meat products using peptide analysis. J. Sci. Food Agric. 27: 827-830 (1976)
4. Hitchcock, C.H.S., Bailey, F.J., Crimes, A.A., Dean, D.A.G. and Davis, P.J. Determination of soya protein in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. J. Sci. Food Agric. 32: 157-165 (1981)
5. Stawick, P.E., Hermodson, M.A. and Nielsenm N.C. Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. J. Biol. Chem. 256: 8752-8755 (1981)
6. Rittenberg, J.H., Adams, A., Palmer, J. and Allen, J.C. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for determination of soy protein in meat products. J. AOAC. 70(3): 582-587 (1987)
7. Kim, C.J., Kim, J.B., Kim, B.C., Lee, S.B., Jung, S.W., Choe, D.Y. and Ko, W.S. Development of immunoassay systems for the assay of soy protein in meat products; The assay of soy protein in meat blends and commercial product by enzyme-linked immunosorbent

assay(ELISA). Korean J. Food Sci. Technol. 24: 204-208 (1992)
8. Shon, D.H., Kim H.J. and Yun, S.S. Property comparison of Polyclonal anti-soy protein antibodies produced for ELISA. Korean J. Food Sci. Technol. In processing.
9. BIOKITS: Soya protein assay kit for the quantitative determination of soya protein in food products by enzyme immunoassay. Cortex diagnostics. pp. 6-7 Newtech square, Deeside industrial park, Deeside, London. (1995)
10. Wolf, W.J. Sulfhydryl content of glycinin: effect of reducing agents J. Agric. Food Chem. 41: 168-176 (1993)

(2000년 5월 16일 접수)