

가공식품 중 메밀 검출을 위한 경합 ELISA의 개발

백수연 · 도정룡 · 손동화*

한국식품연구원 기능평가연구단

Development of Competitive Indirect ELISA for the Detection of Buckwheat in Processed Foods

Su-Yeon Back, Jeong-Ryong Do, and Dong-Hwa Shon*

Functionality Evaluation Research Group, Korea Food Research Institute

Abstract We developed a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ciELISA) for determining the buckwheat content in processed foods by using rabbit polyclonal antibodies against buckwheat proteins (BWP). The detection limit of this assay was 0.05-100 µg/mL. The cross-reactivities of the anti-BWP antibodies toward BWP, buckwheat flour, whole buckwheat, and cereals (wheat flour, whole wheat, black bean, mung bean, red bean, brack rice, brown rice, glutinous rice, white rice, millet, African millet, nonglutinous millet, adlay, and rye) were 100, 17.9, 11.8, and 0%, respectively. Thus, the antibodies were found to be specific for buckwheat only. When buckwheat flour was heated for 30 min, the mean assay recoveries of BWP were 83.0% at 60-90°C and 44.5% at 100°C. The spike test showed that the mean assay recoveries of buckwheat from raw noodle, boiled noodle, starch gel, and cereal flour were 99.1, 98.6, 81.1, and 104%, respectively. For the 22 commercial items tested, the qualitative coincidence ratio of assay result and the corresponding value indicated on the item's package label was 100%. However, the average quantitative coincidence ratios from 12 commercial items were 31.6%. Thus, the results suggest that ciELISA is an efficient tool to detect buckwheat in processed foods.

Keywords: buckwheat proteins, polyclonal antibodies, competitive indirect ELISA (ciELISA), processed foods

서 론

메밀은 계란, 우유, 대두, 밀과 함께 우리나라 국민들에게 가장 많은 식품 알레르기를 유발시키는 5대 원인 식품으로 알려져 있다(1). 식품 알레르기는 특정 식품이나 식품첨가물을 섭취하였을 때 일어나는 유해반응(adverse reaction)의 하나로서, 면역반응이 관여하여 생체가 매우 민감하게 반응하는 특징을 가지고 있다(2). 유해반응으로는 구토, 설사 등의 위장관 증세와 두드러기, 혈관부종, 천식, 비염, 아토피성 피부염, 혹은 신경정신계 이상증상도 동반될 수 있다(3). 특히, 메밀은 알레르기성이 매우 강해서 소량을 섭취 혹은 흡입하여도 위중한 증상을 유발할 수 있으며 우리나라와 일본에서 발생빈도가 높은 것으로 알려져 있다(4). 이처럼 메밀의 섭취가 극심하게 제한되어야 하는 알레르기 환자의 경우, 가공식품에 메밀의 첨가여부를 확인하는 것은 매우 중요하다(5).

메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench)은 사면체의 열매로 분류 학상으로 밀이나 곡류와는 구별되어 견과류(여뀌과)에 속하나, 그 날알의 성분조성이 곡류와 비슷하여 잡곡으로 취급된다(6). 메밀의 단백질 함량은 12-15%로 다른 곡류에 비해 단백질 함량이 높

으며 혈압강하, 혈당조절 뿐만 아니라 심혈관 질환 등 성인병을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 그 수요가 증가하고 있다(7). 메밀은 독특한 맛과 향을 가지고 있어 국수류, 묵류, 과자류, 차류 등 다양한 가공식품에 사용되고 있으므로 사용규정이나 표시에 맞게 적량이 사용되었는지를 확인하는 것은 소비자의 보호 측면에서 꼭 필요하다(8).

또한 가공식품에는 다양한 원재료가 사용되며 가공공정 중 비의도적 혼입이 일어나지만 육안으로는 메밀의 함유여부를 식별 할 수 없으므로 그 검출법의 개발이 필요하다(9). 항체의 특이성을 이용하는 ELISA (효소면역측정법)은 검출감도가 높고 분석시간이 짧으며 많은 시료를 동시에 분석할 수 있는 장점이 있으므로(10), 이를 활용할 필요가 있다.

본 연구에서는 메밀단백질을 실험동물에 면역하여 메밀에 대하여 매우 높은 특이성을 나타내는 항체를 생산하고, 이를 이용하여 간접경합 ELISA 조건을 확립하여 메밀의 열처리에 따른 항체 반응성의 변화, 다른 곡물과의 교차반응, 메밀 첨가량을 달리 한 식품을 제조하여 메밀단백질의 회수율을 확인하고 시판 중인 가공식품 내의 메밀을 검출하였다.

재료 및 방법

재료

Phosphate buffered saline (PBS: 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, pH 7.4), PBS with Tween 20 (PBST, 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027

*Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea

Tel: 82-31-780-9133

Fax: 82-31-709-9876

E-mail: dhs95@kfra.re.kr

Received September 25, 2014; revised February 27, 2014;
accepted March 10, 2014

M KCl, 0.05% Tween 20), phosphate citrate buffer tablet, 3,3', 5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride (TMB), Freund's adjuvant, cabornate-bicarbonate buffer, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. New Zealand White 종 토끼는 한림실험동물(Pyeongtaek, Korea)로부터 구입하였으며, microplate는 Nunc사(Roskilde, Denmark)의 Maxisorp™를, microplate reader는 Molecular Devices 사(Sunnyvale, CA, USA)의 ThermoMax™를 사용하였다. 메밀가루는 봉평농협에서 구입하였으며, 곡류와 가공식품류 시료는 2013년 성남시소재 할인매장과 재래시장에서 구입하였고, 특히 후자의 경우 국내 제품 중 가루식품 3점, 생면 4점, 건면 5점, 과자류 4점, 차류 3점, 묵류 3점, 총 22점을 확보하여 실험에 사용하였다.

면역원의 준비

항체 생산을 위한 면역원으로 메밀가루로부터 단백질을 추출하여 사용하였다. 0.086 M NaCl과 0.033 M NaHCO₃를 증류수에 녹여 만든 buffer와 메밀가루를 10:1의 비율로 섞어 저온실에서 24시간 교반하여 단백질을 추출하였다. 이후 12,000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취해 cut off 3 kDa membrane을 이용한 한의여과(Amicon Ultra, Millipore, Cork, Ireland)를 이용하여 3 kDa 이상의 분획물을 취하였다. 이후 동결건조하여 얻은 메밀 단백질(buckwheat proteins, BWP)을 냉동보관 하였다. 준비된 BWP의 분자량 분포를 확인하기 위해 Laemmli 방법(11)에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다.

특이항체의 생산

Kim 등(12)의 방법에 따라 특이항체를 생산하였다. 토끼의 등 피부에 마리 당 1 mg/mL으로 희석한 면역원(BWP)과 Freund's complete adjuvant를 1:1로 혼합하여 만든 유틸액 1 mL을 피하주사하였다. 이후 추가 면역을 위하여 2주에 한 번씩 주입하였고 adjuvant로서 Freund's incomplete adjuvant를 이용하였다. 매번 면역원을 주입한 일주일 후, 토끼의 귀 정맥으로부터 채혈한 혈액을 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리(4,000×g, 10 min)하여 항혈청을 분리하였다. 혈청은 보존료인 NaN₃ (0.1%) 첨가하여 -80°C에서 보관하며 사용하였다.

간접 경합 ELISA (ciELISA)

면역원인 BWP를 2 µg/mL의 농도로 coating buffer (tris hydroxymethyl aminomethane 0.05M, pH 9.0)에 희석하였다. 이를 microplate well에 100 µL씩 분주하여 4°C에서 하룻밤 정치하였다. 이것을 PBST washing buffer로 3회 세척한 다음, 1/10,000로 희석한 항혈청과 적당 배율로 희석한 시료를 1:1로 혼합하였다. 이 혼합액을 각 well 당 100 µL씩 넣고 1시간 반응시켜 경합반응을 유도한 후 다시 3회 세척하고 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate를 100 µL씩 첨가하여 1시간동안 반응시켰다. 다시 3회 세척한 후 기질용액(0.01% TMB in phosphate-citrate buffer pH 5.0, 0.001% H₂O₂)을 100 µL씩 첨가하여 30분 반응시킨 뒤 2 M H₂SO₄를 50 µL씩 가하여 반응을 정지시키고 microplate reader를 사용하여 흡광도(A₄₅₀)를 측정하였다. 모든 시료는 3반복 처리하여 얻은 평균값을 사용하였다.

시료의 처리

분석용 시료의 단백질 추출을 위하여 1 g의 시료에 10 mL의 PBS를 넣고 homogenizer (Ultra Turrax T125, IKA-Labortechnik,

Staufen, Germany)를 이용하여 4,500×g에서 1분간 균질화한 다음 1,000 g에서 10분간 원심분리하고 상정액을 회수하였다. 이를 다시 PBS로 적당배율 희석하여 분석에 사용하였다.

특이항체의 교차반응

특이항체가 면역원(BWP) 이외의 곡류 등 식품에 대해 반응하는 정도를 조사하였다. 즉, 메밀가루, 통메밀, 밀가루, 통밀, 검정콩, 기장, 녹두, 메조, 백미, 쌀보리, 율무, 찰수수, 찹쌀, 팥, 현미 등을 시료처리 방법에 따라 준비한 후, 각각 여러 농도의 시료용액에 대하여 ciELISA를 실시하였다. 본 연구에서 특이항체의 교차반응율은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Cross-reactivity (\%)} = \frac{(C_{A450=1/2\max} \text{ of BWP})}{(C_{A450=1/2\max} \text{ of cereal})} \times 100$$

단, 여기에서 C_{A450=1/2max}은 ciELISA의 수치(A₄₅₀)가 최고발색치의 50%를 나타낼 때의 시료 농도를 나타냄.

메밀의 열안정성 조사

면역원(BWP) 또는 메밀가루(0.5% in PBS)를 25, 60, 70, 80, 90, 100°C에서 각각 30분간 열처리하고 1,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상정액에 대하여 ciELISA를 실시하였다. 이때 메밀의 열안정성은 처리온도별 반응율을 기준으로 판단하였으며, 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Reactivity (\%)} = \frac{(C_{A450=1/2\max} \text{ at } 25^\circ\text{C})}{(C_{A450=1/2\max} \text{ at the given temperature})} \times 100$$

단, 여기에서 C_{A450=1/2max}은 ciELISA의 수치(A₄₅₀)가 최고발색치의 50%를 나타낼 때의 시료 농도를 나타냄.

검출법의 신뢰성 검정 및 시판시료의 분석 ELISA

검출법의 신뢰성을 검정하기 위하여 spike test를 실시하였다. 즉, 가공식품(메밀 생면, 메밀 삶은 면, 메밀묵, 메밀곡물가루)을 준비하여 그 속에 함유된 BWP의 함량을 ciELISA로 분석하였다. 메밀 생면과 삶은 면은 메밀가루와 밀가루를 일정비율로 혼합한 분말 200 g 당 1.8% 식염수 80 g을 10분간 상온에서 반죽한 다음 비닐에 싸서 20분간 상온 숙성시켰다(13). 숙성시킨 반죽을 제면기를 이용해 지름 1.2 mm의 중면을 뽑았다. 완성된 생면을 끓는 물에 5분간 삶아 찬물에 식힌 후 완전히 물을 제거하여 사용하였다. 메밀묵은 메밀가루와 청포가루(녹두전분70%, 옥수수전분30%)를 일정비율로 혼합한 분말 100 g에 물 500 mL을 넣고 중불에서 15분간 저으면서 가열하여 호화시킨 뒤 플라스틱 통에 부어 응고시켜 사용하였다. 메밀곡물가루는 메밀가루와 혼합곡물가루(보리 45%, 현미 45%, 검정콩 10%)를 일정량 섞어 spike test에 사용하였다. 이를 중 수분을 많이 함유한 면과 묵은 각 시료 5 g씩 105°C 상압건조법을 이용하여 수분함량을 측정하였다. 또한, 분석 시료의 단백질 추출은 '시료의 처리' 방법에 따라 준비하고 PBS로 적정배율 희석하여 ciELISA를 실시하였다. 또한 본 연구에서 개발한 ciELISA를 이용하여 시판 시료 22점의 메밀 함량을 분석하였다.

결과 및 고찰

특이항체의 생산 및 ciELISA 확립

메밀로부터 분리한 단백질(BWP)을 면역원으로 사용하고자 '제료 및 방법'에 따라 추출하여 BWP의 단백질 분자량 분포를 SDS-

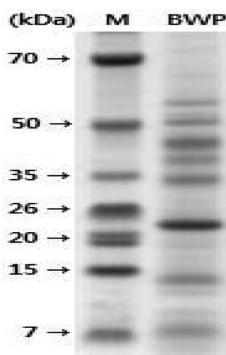


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of buckwheat proteins (BWP). Lane (M) is a molecular weight marker.

PAGE로 확인하였다. 그 결과, 주요 band는 분자량 8, 14, 24, 30-60 kDa으로 나타내었다. 이러한 BWP를 실험동물에 면역하여 생산한 항체는 추가 면역을 실시할수록 대체로 높은 항체가를 나타내었으며 4차 혈청으로부터 생산된 특이항체를 분석용으로 사용하였다(data 생략). BWP의 정량을 위한 ciELISA의 조건을 확립하고 그 표준곡선을 작성하였다(Fig. 2). 경합반응에 의한 BWP 검출범위는 0.05-100 µg/mL로 나타나 검출감도가 양호하였다.

특이항체의 교차반응

16종의 곡물에 대한 특이항체의 교차반응성을 ciELISA로 비교한 결과 항BWP 항체의 BWP에 대한 반응성을 100%로 보았을 때 메밀가루는 17.9%, 통메밀은 11.8%를 나타내었다(Fig. 3, Table 1). 그 결과 메밀가루에는 단백질이 17.9% 함유되었음을 알 수 있었다. 그러나 그 외에 밀가루, 통밀, 검정콩, 기장, 녹두, 메조, 백미, 쌀보리, 옮무, 찰수수, 찹쌀, 팔, 현미 등 14종의 곡물에서는 특이항체가 반응을 하지 않았다. 본 연구에서 생산한 항BWP 항체는 메밀에 대하여 매우 특이적으로 반응한 반면 다른 곡물에 대하여 반응이 거의 없었다.

메밀의 열안정성

메밀의 열처리에 따른 항BWP 항체의 반응성을 ciELISA로 조사하였다(Fig. 4, Table 2). 우선 BWP를 60-100°C까지 각각 30분간 열처리하여 특이항체와의 반응성을 확인한 결과, 상온처리에 비하여 각 온도별 반응성이 75.8, 70.1, 40.4, 19.8, 1.91%로 나타

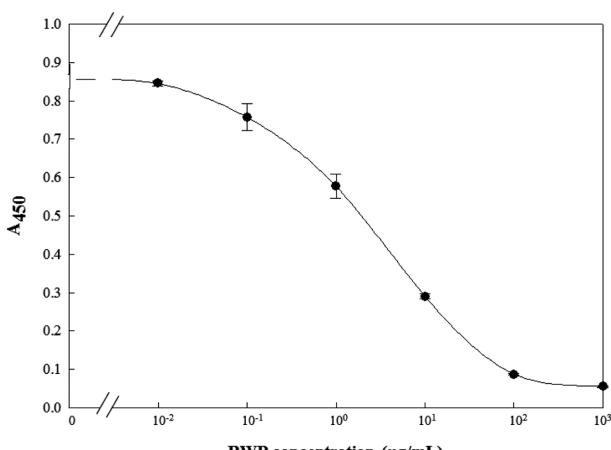


Fig. 2. Standard curve of buckwheat proteins (BWP) by ciELISA.

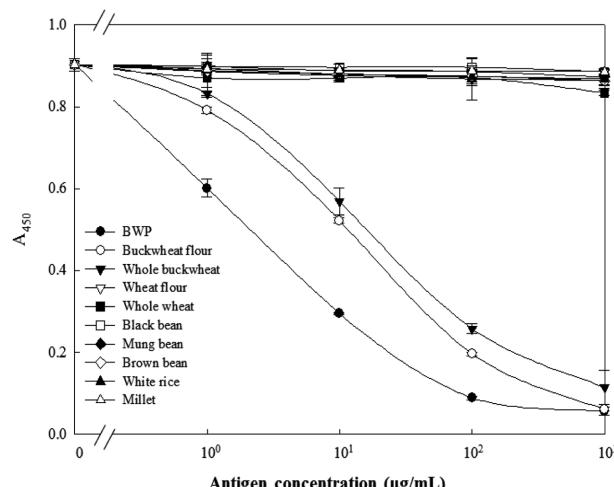


Fig. 3. Reactivity of anti-BWP antibodies towards cereals as determined by ciELISA.

Table 1. Cross-reactivity of anti-BWP antibodies towards cereals as determined by ciELISA

Cereal	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	Cross-reactivity (%) ²⁾
BWP	2.72	100
Buckwheat flour	25.2	17.9
Whole buckwheat	23.0	11.8
Others ³⁾	∞	0

¹⁾IC₅₀ is the concentration of analyte inducing 50% of maximal absorbance in ciELISA.

²⁾Cross-reactivity (%)=(IC₅₀ of BWP/IC₅₀ of cereal)×100

³⁾Others: wheat flour, whole wheat, black bean, mung bean, red bean, black rice, brown rice, glutinous rice, white rice, millet, african millet, nonglutinous millet, adlay, and rye

났으며 80°C 이상 열처리시 반응성이 불안정하였다. 식품 단백질의 열처리는 항원결정기의 변형을 유발시키고, 그와 함께 단백질의 용해성도 매우 낮아져 ELISA 검출을 어렵게 하였다(14). 한편, 메밀가루의 열안정성을 같은 방법으로 조사하였을 때 60-90°C 가열 처리 시 반응성은 74.4-89.0%, 100°C는 44.5%의 반응성을 나타내었으나 BWP보다 열안정성이 높았다. 그 이유는 메밀가루의 경우 검출대상인 단백질(BWP)을 둘러싸고 있는 전분이나 섬유질 등 다른 성분들이 열에 보호 작용하였기 때문이라 생각된다(15). 본 연구에서 개발한 ciELISA로 90°C이하에서 열처리한 메밀 중의 BWP 검출은 우수하였다.

신뢰성 검정(Spike test)

ciELISA 분석법의 신뢰성 검증을 위하여 메밀가루를 첨가하여 만든 대표적인 가공식품의 BWP 함량을 ciELISA로 검출하고 표준곡선으로부터 분석수치와 분석회수율을 조사하였다. 가공식품군은 메밀 생면, 메밀 삶은 면, 메밀묵, 메밀곡물가루이었다. 먼저 밀가루에 메밀가루 1, 3, 10, 30, 100%를 첨가하여 제조한 메밀 생면의 BWP 함량은 각각 1.8, 5.4, 17.9, 53.7, 179 mg/g이었고 수분함량은 평균 35.9%이었다. 메밀 생면의 BWP 함량을 ciELISA로 검출하여 회석값, 수분함량 등을 고려하여 구한 BWP 함량의 분석수치는 각각 0.84, 5.03, 20.1, 64.6 mg/g이며 그 분석회수율은 각각 47.2, 93.7, 112, 120, 123%로 평균 99.1%로 나타났다(Table 3). 이러한 메밀 생면을 끓는 물에 5분간 삶은 면을 분석한 결과, 수분함량은 평균 55.7%이고 메밀 첨가량에 따른 분

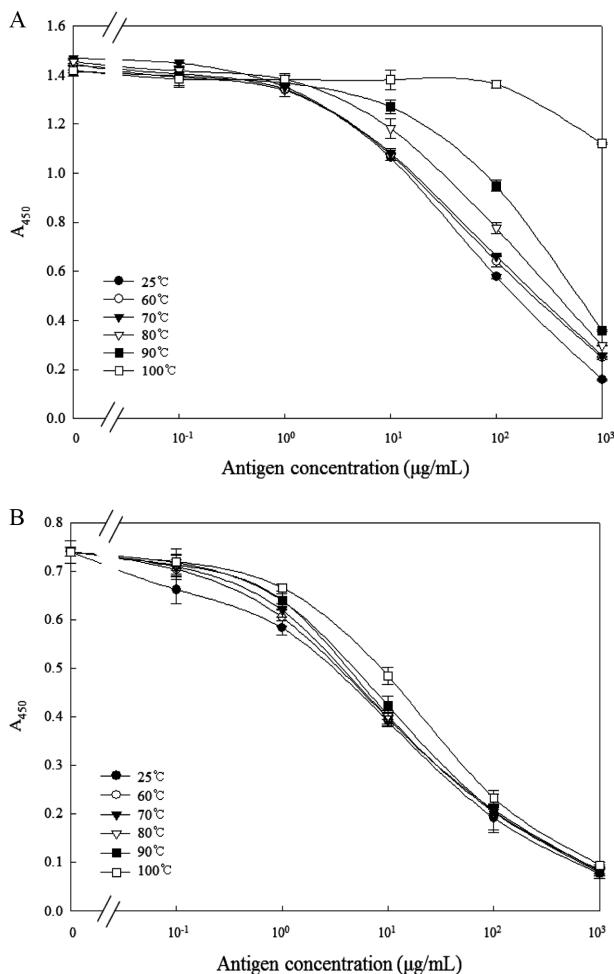


Fig. 4. Heat stability of BWP (A) and buckwheat flour (B) as determined by ciELISA. BWP and buckwheat flour were homogenized and heat-treated at each temperature for 30 min.

석회수율은 각각 97.2, 93.1, 71.5, 113, 118%로 평균 98.6%를 나타내었다(Table 4). 이 결과 메밀 생면을 높은 온도에서 삶아도 메밀가루 중의 BWP의 열 안정성이 높아 메밀 생면과 삶은 면의 BWP 분석회수율은 비슷하게 나타났다. 이와 유사한 실험으로 Panda 등(16)은 메밀면의 sandwich ELISA를 실시한 결과 90.0%의 회수율을 나타내었다. 그에 비하면 본 연구에서 ciELISA를 이용한 메밀 분석법이 더 우수하다고 생각된다. 다음으로 메밀목에 적용하였을 때 청포가루에 메밀가루 1, 3, 10, 30, 100%

Table 2. Reactivity of anti-BWP antibodies towards heat-treated buckwheat by ciELISA

Heat treatment (°C) ¹⁾	BWP		Buckwheat flour	
	IC ₅₀ (μg/mL) ²⁾	Reactivity (%) ³⁾	IC ₅₀ (μg/mL)	Reactivity (%)
25	57.0	100	12.5	100
60	75.2	75.8	14.1	88.7
70	81.3	70.1	14.5	86.2
80	141	40.4	14.9	83.9
90	288	19.8	16.8	74.4
100	2980	1.91	28.1	44.5

¹⁾Buckwheat solution (0.5 mg/mL in PBS) was heated at each temperature for 30 min.

²⁾IC₅₀ is the concentration of analyte inducing 50% of maximal absorbance in ciELISA.

³⁾Reactivity (%)=(IC₅₀ at 25°C/IC₅₀ at heat-treated temperature)×100

를 첨가하여 제조한 메밀묵의 수분함량은 평균 81.7%이며 그 분석회수율은 각각 55.1, 88.3, 78.8, 92.2, 90.8%로 평균 81.1%를 나타내었다(Table 5). 마지막으로 메밀곡물가루를 적용하였을 때, 보리, 현미, 검정콩 등 세 가지 혼합곡물가루에 메밀가루 1, 3, 5, 10, 20% 첨가한 메밀곡물가루의 분석회수율은 각각 84.8, 119, 102, 105, 109%이고 평균 104% 회수율로 가공식품 중 가장 양호하였다(Table 6). 이처럼 본 연구에서 개발한 ciELISA로 4가지 가공식품에 메밀을 첨가하여 분석한 결과 분석값이 매우 우수하였다.

가공식품 중 메밀의 검출

시중에 유통되는 가루식품, 생면, 건면, 과자류, 차류, 뮤류 등 6종, 총 22점 가공식품 중 메밀 함량을 ciELISA에 의해 검출하였다(Table 7). 메밀시료의 분석결과를 살펴보면, 1번 시료 내 BWP 함량은 13.3 mg/g으로 나타났다. 앞서 교차반응에서 메밀 내 단백질 함량이 17.9%라고 했으므로 1번 시료의 메밀 함량은 74.3 mg/g으로, 총 7.43%를 함유하였다. 이 제품에 표시된 메밀 함량 40%이므로 이를 기준으로 구한 메밀회수율은 18.6%이었다. 동일한 방법으로 실험한 2번 시료의 경우 메밀함량은 6.2%이고 회수율은 31.0% 나타냈으며, 3번 시료(밀가루)는 전혀 검출되지 않았다. 생면 시료 4-6번의 분석결과 메밀함량은 각각 8.63, 16.5, 0.33%이고 분석회수율 각각 46.9, 94.8, 8.7%로 나타났으며 7번 시료(우동)는 검출되지 않았다. 또한 건면 시료 8-10번의 분석결과 메밀함량은 33.0, 22.9, 0.28%이고, 분석회수율은 각각 94.3, 76.3, 2.3%를 나타냈다. 반면 11번 시료는 분석결과 메밀함량은

Table 3. Assay recovery of buckwheat proteins (BWP) in raw noodle¹⁾ as determined by ciELISA

Buckwheat flour added (%)	BWP added (mg/g) ²⁾	Dilution ratio	ELISA value	BWP detected (μg/mL)	Moisture content (%)	BWP assayed (mg/g) ³⁾	Recovery (%) ⁴⁾
0	0	1/10,000	0.863	0	37.0	0	-
1	1.78	1/10,000	0.795	0.053	36.6	0.84	47.2
3	5.37	1/10,000	0.679	0.319	36.6	5.03	93.7
10	17.9	1/10,000	0.548	1.27	36.8	20.1	112
30	53.7	1/10,000	0.382	4.20	34.9	64.6	120
100	179	1/10,000	0.241	14.7	33.6	221	123

¹⁾Raw noodle spiked with buckwheat flour (BWF) was homogenized, centrifuged and diluted with PBS for the quantitation of buckwheat proteins (BWP) by ciELISA.

²⁾BWP added (mg/g)=BWF (mg/g)×17.9/100 (BWF:BWP=100:17.9)

³⁾BWP assayed (mg/g)=BWP detected (μg/mL)×(1-moisture content/100)/dilution ratio

⁴⁾Recovery (%)=BWP assayed (mg/g)/BWP added (mg/g)×100

Table 4. Assay recovery of buckwheat proteins (BWP) in boiled noodle¹⁾ as determined by ciELISA

Buckwheat flour added (%)	BWP added (mg/g) ²⁾	Dilution ratio	ELISA value	BWP detected (μg/mL)	Moisture content (%)	BWP assayed (mg/g) ³⁾	Recovery (%) ⁴⁾
0	0	1/1,000	0.751	0	54.3	0	-
1	1.78	1/1,000	0.610	0.74	57.2	1.73	97.2
3	5.37	1/1,000	0.470	2.12	57.6	5.00	93.1
10	17.9	1/1,000	0.354	5.50	57.1	12.8	71.5
30	53.7	1/1,000	0.185	27.2	55.0	60.5	113
100	179	1/1,000	0.105	99.0	53.2	211	118

¹⁾Bolied noodle spiked with buckwheat flour (BWF) was homogenized, centrifuged and diluted with PBS for the quantitation of buckwheat proteins (BWP) by ciELISA.

²⁾BWP added (mg/g)=Buckwheat flour (mg/g)×17.9/100 (buckwheat flour:BWP=100:17.9)

³⁾BWP assayed (mg/g)=BWP detected (μg/mL)×(1-moisture content/100)/dilution ratio

⁴⁾Recovery (%)=BWP assayed (mg/g)/BWP added (mg/g)×100

Table 5. Assay recovery of buckwheat proteins (BWP) in buckwheat starch gel¹⁾ as determined by ciELISA

Buckwheat flour added (%)	BWP added (mg/g) ²⁾	Dilution ratio	ELISA value	BWP detected (μg/mL)	Moisture content (%)	BWP assayed (mg/g) ³⁾	Recovery (%) ⁴⁾
0	0	1/10,000	0.868	0	82.2	0	-
1	1.78	1/10,000	0.823	0.019	80.6	0.98	55.1
3	5.37	1/10,000	0.776	0.088	81.4	4.74	88.3
10	17.9	1/10,000	0.705	0.275	80.5	14.1	78.8
30	53.7	1/10,000	0.582	0.89	82.0	49.5	92.0
100	179	1/10,000	0.453	2.61	83.5	163	91.1

¹⁾Buckwheat starch gel spiked with buckwheat flour (BWF) was homogenized, centrifuged and diluted with PBS for the quantitation of buckwheat proteins (BWP) by ciELISA.

²⁾BWP added (mg/g)=Buckwheat flour (mg/g)×17.9/100 (buckwheat flour:BWP=100:17.9)

³⁾BWP assayed (mg/g)=BWP detected (μg/mL)×(1-moisture content/100)/dilution ratio

⁴⁾Recovery (%)=BWP assayed (mg/g)/BWP added (mg/g)×100

Table 6. Assay recovery of buckwheat proteins (BWP) in cereals mix powder¹⁾ as determined by ciELISA

Buckwheat flour added (%)	BWP added (mg/g) ²⁾	Dilution ratio	ELISA value	BWP detected (μg/mL)	BWP assayed (mg/g) ³⁾	Recovery (%) ⁴⁾
0	0	1/10,000	0.864	0	0	-
1	1.78	1/10,000	0.745	0.151	1.51	84.8
3	5.37	1/10,000	0.626	0.64	6.40	119
5	8.95	1/10,000	0.587	0.91	9.10	102
10	17.9	1/10,000	0.496	1.88	18.8	105
20	35.8	1/10,000	0.398	3.90	39.0	109

¹⁾Cereals mix powder spiked with buckwheat flour (BWF) was homogenized, centrifuged and diluted with PBS for the quantitation of buckwheat proteins (BWP) by ciELISA.

²⁾BWP added (mg/g)=BWF (mg/g)×17.9/100(BWF:BWP=100:17.9)

³⁾BWP assayed (mg/g)=BWP detected (μg/mL)/dilution ratio

⁴⁾Recovery (%)=BWP assayed (mg/g)/BWP added (mg/g)×100

0.11%로 나타났으나 메밀함유량이 정확히 표기되지 않아 분석회수율을 구할 수 없었다. 12번 시료(소면)는 메밀이 검출되지 않았다. 그 외에 스낵, 차, 묵 시료는 분석회수율은 낮았으나 정성적으로 검출되었으며 메밀이 함유되지 않은 식품에서는 전혀 검출되지 않았다.

가공식품의 메밀 검출 평균 분석회수율은 31.6%로 메밀함량 분석치가 표시된 것보다 낮게 나타났다. 이와 같이 spike test에서 분석회수율이 매우 우수한 ciELISA로 시중 제품을 검사했을 때 메밀 분석회수율이 낮게 나타나는 까닭은 분석과정의 문제보다 제품 표시사항과 실제 첨가한 메밀함량에 차이가 있지 않았나 생각된다. 하지만 제품에 표시된 메밀의 함유여부는 100% 일치하였다.

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 BWP에 대한 특이항체를 이용한 ciELISA는 가공식품 중 메밀의 함유유무를 정량적 또는 정성적으로 분석하는데 효과적으로 활용될 수 있을 것이다.

요약

메밀로부터 분리한 메밀단백질(BWP)을 토끼에게 면역하여 생산한 특이항체를 이용하여 가공식품 중 메밀의 검출을 위한 간접경합 효소면역측정법(ciELISA)을 확립하였다. 이때, BWP의 검출범위는 0.05-100 μg/mL이었다. 특이항체 교차반응 결과, BWP, 메밀가루, 통메밀에 대한 반응성은 각각 100, 17.9, 11.8%를 나타내었으며 그 외 곡물 14종에 대한 반응성은 거의 나타나지 않아

Table 7. Detection of buckwheat in commercial foods as determined by ciELISA

Type of food	Article code	Common food name	Labeled buckwheat concentration (%)	Assay			Recovery (%) ²⁾	Remark ³⁾
				BWP (mg/g)	Buckwheat (mg/g) ¹⁾	Buckwheat (%)		
Flour	1	buckwheat flour	40	13.3±0.28	74.3	7.43	18.6	O
	2	buckwheat flour	20	11.1±0.28	62.0	6.20	31	O
	3	wheat flour (Korean pancake mix)	none	N.D. ⁴⁾	N.D.	N.D.	-	O
Raw noodle	4	buckwheat noodle	18.4	15.5±0.98	86.3	8.63	46.9	O
	5	buckwheat noodle	17.4	29.5±1.82	165	16.5	94.8	O
	6	buckwheat noodle	3.8	0.6±0.06	3.34	0.33	8.7	O
	7	noodle (Udon)	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O
Dried noodle	8	buckwheat noodle	35	59±2.83	330	33.0	94.3	O
	9	buckwheat noodle	30	41±0.10	229	22.9	76.3	O
	10	Naengmyeon	12	0.51±0.06	2.82	0.28	2.3	O
	11	Naengmyeon	premix buckwheat powder	0.19±0.01	1.08	0.11	-	O
	12	noodle	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O
Snack	13	buckwheat snack	15	0.74±0.06	4.11	0.41	2.7	O
	14	buckwheat and brown rice snack	10	0.48±0.08	2.65	0.27	2.7	O
	15	five cereals snack	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O
	16	rye and rice snack	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O
Tea	17	buckwheat tea	100	0.85±0.1	4.75	0.47	0.5	O
	18	brown rice tea	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O
	19	barley tea	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O
Gel	20	acorn starch gel	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O
	21	mung bean starch gel	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O
	22	agar gel	none	N.D.	N.D.	N.D.	-	O

¹⁾Buckwheat content was deduced from the result of buckwheat proteins (BWP) concentration:BWP corresponds to 17.9% (w/w) of buckwheat (Table 2).

²⁾(Buckwheat content assayed/buckwheat content labeled)×100

³⁾"O" means qualitative coincidence of ELISA result with indication on the food package.

⁴⁾N.D.=not detected.

메밀에 대한 특이성이 매우 높았다. 메밀가루는 60-90°C에서 반응성이 평균 83.0%를 나타내었으며 100°C에서는 44.5%로 반응성이 감소하였다. 메밀가루에 대한 spike test에서 메밀 생면, 삶은 면, 묵, 메밀곡물가루에서 평균 분석회수율이 각각 99.1, 98.6, 81.1, 104%로 매우 높게 나타났다. ciELISA에 의하여 22점의 시판시료 중 메밀의 함유량을 조사한 결과, 메밀 함유 표시된 12점에서 평균 분석회수율은 31.6%로 나타났으나 시료 중 메밀의 정성적 검출은 100%로 매우 우수하였다. 본 연구에서 개발한 ciELISA는 가공식품에 함유된 메밀을 검출하는데 매우 효과적으로 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 연구비 지원으로 수행한 연구결과의 일부입니다.

References

- Son DY, Yoon KR, Lee SI. Study of the most common allergic foods in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 885-888 (2002)
- Cianferoni A, Spergel JM. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol. Int.* 58: 457-466 (2009)
- Kim YH, Kim JW, Houh W. A study on incidence and genetic background of atopic dermatitis. *Korean J. Dermatol.* 17: 105-110 (1979)
- Lee SY, Oh SJ, Lee KS, Jang YJ, Sohn MH, Lee KE, Kim KE. Murine model of buckwheat allergy by intragastric sensitization with fresh buckwheat flour extract. *J. Korea Med. Sci.* 20: 566-572 (2005)
- Sampson HA. Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 805-819 (2004)
- Pomeranz Y, Robbins GS. Amino acid composition of buckwheat. *J. Agri. Food Chem.* 20: 270-274 (1972)
- Choe M, Kim JD, Park KS, Oh SY, Lee SY. Effect of buckwheat supplementation on blood glucose levels and blood pressure in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 20: 300-305 (1991)
- Suh YJ, Yoon SH, Shin YS, Choi JH, Suh Ch, Nahm DH, Kim YK, Min KU, Park HS. Buckwheat allergy in adults: comparison of specific IgE between homemade ELISA and CAP system, and identification of IgE-binding components. *Allergy Asthma Resp. Dis.* 23: 474-482 (2003)
- Park YC, Kim MR, Shin JH, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Lee SJ, Han SB. Development of PCR method for rapid detection of allergic materials in foods. *J. Fd. Hyg. Safety* 28: 124-129 (2013)
- Kwak BY, Ko SH, Park CW, Son DY, Shon DH. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for glyphosate-tolerant soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 366-372 (2003)
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- Kim HJ, Shon DH. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of cooked goat meat. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 538-543 (2000)
- Kim KY. Cooking properties of low caloric buckwheat taste noo-

- dle. Korean J. Food Cook. Sci. 21: 823-828 (2005)
14. Taylor SL, Nordlee JA, Niemann LM, Lambrecht DM. Allergen immunoassays-considerations for use of naturally incurred standards. Anal. Bioanal. Chem. 395: 83-92 (2009)
15. Faeste CK, Plassen C. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. J. Immunol. Methods 329: 45-55 (2008)
16. Panda R, Taylor SL, Goodman RE. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of buckwheat residues in food. J. Food Sci. 75: T110-117 (2010)