물리적 처리에 의한 돼지고기의 항원성 변화

김서진 · 김꽃봉우리 · 송유진 · 이소영 · 윤소영 · 이소정 · 이청조 · 박진규¹ · 이주운¹ · 변명우¹ · 안동현*

부경대학교 식품공학과/식품연구소

¹한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소 방사선식품생명공학연구실

Changes of Pork Antigenicity by Heat, Pressure, Sonication, Microwave, and Gamma Irradiation

Seo-Jin Kim, Koth-Bong-Woo-Ri Kim, Eu-Jin Song, So-Young Lee, So-Young Yoon, So-Jeong Lee, Chung-Jo Lee, Jin-Gyu Park¹, Ju-Woon Lee¹, Myung-Woo Byun¹, and Dong Hyun Ahn*

Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract

The purpose of this study was to search for physical treatments to reduce allergenicity of pork. Physical treatments such as heating, autoclave, microwave, sonication, and irradiation have been used for food processing or reduction of allergenicity. The porcine serum albumin (PSA), known as a major allergen in pork, was extracted after physical treatments. The antigenicity of pork extracts by heating (80 and 100°C for 20 min), autoclave (121°C for 5, 10, and 30 min), and microwave (for 5 and 10 min) was significantly decreased. Especially, the binding ability of p-IgG to pork extracts by autoclave for 30 min showed the greatest decrease (about 3%) in physical treatments. However, the antigenicity of pork was unaffected by sonication and irradiation treatment. These results indicated that the autoclave treatment was the most effective method to reduce the antigenicity of pork.

Key words: PSA, pork, physical treatments, antigenicity

서 론

우리나라 국민 1인당 육류 소비량은 2007년 기준으로 쇠고기 7.6 kg, 닭고기 8.6 kg, 돼지고기 19.2 kg임을 미루어 볼 때 돼지고기는 국내에서 가장 많이 소비되는 식육류이다. 이 외에도 돼지고기는 지난 40여 년간 가장 빠른 소비 증가 추세를 나타내었는데, 1970년에서 2008년 사이 1인당 돼지고기 소비량의 연평균 증가율은 5.26%로 쇠고기와 닭고기가 각각 4.86%, 4.78%를 나타낸 것에 비해 높았다(Ahn and Jo, 2009).

한편, 돼지고기는 쇠고기에 비하여 콜레스테롤 함량이 낮으며 vitamin B군 뿐만 아니라 필수지방산인 vitamin F

도 다량 함유하고 있는 식품이다(Wood *et al.*, 1999). 또한, 육색이 옅고 조직이 부드러우며 많은 양의 필수아미노산이 함유되어 있다(Hah *et al.*, 2005). 이와 같이 돼지고기는 우리나라에서 소비량이 높으며 중요한 단백질 공급원이지만, 한편으로는 식품 등의 표시기준에 따라 국내 주요 알레르기 유발식품으로 지정되어 있어(Korea Food and Drug Administration, 2008) 돼지고기 알레르기에 대한 심각성이 점차 높아지고 있다. Moon 등(2007)의 연구에서도 콩, 우유, 치즈, 난백 및 돼지고기의 식품이 어린이 알레르기 질환과 관련 있는 주요 식품이라고 보고하여 돼지고기 알레르기에 대한 연구가 필요함을 시사하였다. 돼지고기 알레르기의 주요 항원은 65 kDa 해당하는 serum albumin으로 밝혀졌으나(Donnay *et al.*, 2006), 이 외에도 60, 50 및 44 kDa에 해당되는 성분이 우리나라 사람에게 알레르기를 유발할 가능성이 높은 것으로 알려졌다(Chung *et al.*, 2001). 또한, PSA는 다른 serum albumin들과도 교

*Corresponding author : Dong-Hyun Ahn, Dept. of Food Science and Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea. Tel: 82-51-629-5831, Fax: 82-51-629-5824, E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

차반응을 일으키는데, bovine serum albumin(BSA)과 높은 상동성을 나타내며 cat dander allergy와도 교차반응을 일으킨다고 보고되었다(Fiocchi *et al.*, 2000; Mamikoglu and Pocahontas, 2005).

호흡기 알레르기의 경우에는 적은 양의 알레르겐을 투여할 때마다 증량시켜 탈감작 상태를 유도하여 면역학적 관용을 이루어내는 면역치료가 효과적으로 사용되고 있으나, 식품 알레르기에서는 부작용의 빈도가 높아 일반적으로 적용되지 못하고 있다(Oppenheimer *et al.*, 1992). 원인 식품을 제한하는 식이요법 및 약물요법이 식품 알레르기의 치료법으로 많이 이용되고 있지만, 성장 발달 장애를 비롯한 영양실조와 섭식장애 등의 부작용을 유발할 수 있으므로 근본적인 해결책이 시급한 실정이다(Kim, 2006).

최근에는 식품가공에 사용되는 열(Kim *et al.*, 2009), 압력(Naoyuki *et al.*, 2006), 초음파(Li *et al.*, 2006), microwave(Kim *et al.*, 2006) 및 방사선(Kang *et al.*, 2002) 등의 물리적 처리방법이 식품의 알레르겐성을 변화시킬 수 있다고 보고되었다. 특히, 항체와 결합하는 단백질의 epitope를 물리적 처리법에 의해 파괴 또는 변형시키면 알레르겐성이 감소된다는 연구가 보고되었지만(Ehn *et al.*, 2004), 대표적인 알레르기 유발 식품인 우유(Jeong, 1995; Zeece *et al.*, 2008) 및 계란(Julia *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2007)에 대해서만 연구가 많이 이루어지고 있어 돼지고기의 알레르겐성 저감화에 대한 연구가 요구되는 바이다.

따라서 본 연구에서는 돼지고기에 가열, 가압가열, microwave, 초음파 및 감마선을 다양한 온도와 시간으로 처리한 후 PSA의 항원성 변화를 살펴봄으로써 돼지고기의 알레르겐성 감소에 가장 효과적인 처리 방법과 조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

재료

돼지고기 등심은 부산 동원식육점에서 당일 도살한 신선한 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

표준항원 및 항체

표준 항원인 PSA와 anti-goat IgG peroxidase conjugate는 Sigma사(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA)에서 구입하였으며 goat polyclonal-IgG는 Bethyl사(Bethyl laboratories Inc., USA)에서 구입하였다.

가열 처리

시험관에 잘게 자른 적당량의 돼지고기 등심을 넣고 water bath에서 60°C에서 60분, 70°C에서 25분, 80과 100°C에서 각각 20분 동안 가열처리하였다. 그 후 얼음에서 냉각시킨 다음 PSA를 추출하여 실험에 사용하였다.

가압가열 처리

돼지고기 등심을 잘게 자른 후 각각 시험관에 적당량 취하였다. 시료가 들어있는 시험관을 가압 멸균기(DW-AC 920, D.W. Industries, Korea)에 넣고 게이지압 1 kg/cm², 온도 121°C에서 5, 10 및 30분 동안 가압가열 처리하였다. 얼음에서 냉각시킨 후 PSA를 추출하여 실험에 사용하였다.

Microwave 처리

잘게 세절한 돼지고기를 시험관에 적당량 취한 후 2,450 MHz 주파수로 1, 5 및 10분간 microwave(MW-272LB, LG, Korea) 처리하였다. 또한 microwave의 작용만을 실험하기 위해 돼지고기가 들어있는 시험관을 얼음물에 넣고 1분 간격으로 얼음물과 교환하면서 온도를 6-9°C로 유지시켜 열의 작용을 배제하였다. 낮은 온도에서 microwave를 처리한 시간은 1, 5, 10 및 20분이며, 두 가지 처리 모두 PSA를 추출하여 실험에 사용하였다.

초음파 처리

돼지고기를 잘게 세절한 후 적당량 취하고 2배량의 0.01 M PBS를 가하였다. 이 혼합물을 homogenizer(AN-7, Acc Homogenizer, Nihonseiki, Japan)로 10,000 rpm에서 1분간 균질화 하였다. 초음파 분쇄기(VC 100, Sonics & Materials, Japan)의 지름 1인치 tip으로 균질액을 pulse 20%, 20±1 Watts, pulse on/off 5 sec의 조건 하에서 5, 10, 30 및 60 분간 초음파 처리하였으며, 이 때 초음파로 인한 열 발생을 막기 위하여 시험관 주위에 얼음물을 채워 사용하였다. 초음파 처리한 돼지고기 균질액은 PSA 획분 분리방법의 원심분리과정부터 동일한 조건으로 추출하여 실험에 사용하였다.

감마선 처리

돼지고기 등심은 두께 2 cm로 절단한 후 합기 포장하였다. 합기 포장 상태의 돼지고기는 정읍 방사선 연구소의 Co-60 감마선 조사시설(IR-79 gamma irradiator, MDS Nordion, Canada)을 이용하여 시간당 10 kGy의 선량율로 1, 3, 10 및 20 kGy의 흡수선량을 받도록 조사하였다. 이때 흡수선량의 확인은 방사선 선량계(ceric-cerous dosimeter, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하여 총 흡수선량의 오차를 계산하였다. 조사실의 온도는 20±1°C였으며 감마선을 조사한 시료는 세절한 뒤 PSA를 추출하여 실험에 사용하였다.

PSA의 획분 분리

Wang 등(2002)의 방법을 인용하여 PSA 획분을 추출하였다. 가열, 가압가열, microwave 및 감마선 처리한 돼지고기에 2배의 0.01 M PBS를 가하였다. 이 혼합물을 homogenizer를 이용하여 10,000 rpm에서 1분간 균질화한 후 원

심분리기(Supra 30K, Hanil Science Co., Korea)로 16,000 ×g, 30분간 원심분리하였다. 5A filter paper(Advantec, Japan)를 이용하여 상층액을 여과하고 BCA protein assay kit(Pierce, USA)로 단백질 농도를 1 mg/mL로 보정한 후 ci-ELISA, SDS-PAGE 및 immunoblotting에 사용하였다.

Ci-ELISA

Lee 등(1998)의 방법을 변형하여 PSA의 항원성을 측정하였다. Costar 96-well flat bottom plate(469957; Nunc, Kamstrupvej, Denmark)의 well에 0.2 M bicarbonate coating buffer(pH 9.6)로 희석한 PSA(10 µg/mL)를 100 µL씩 분주하여 4°C에서 overnight 하였다. 1% gelatin 용액으로 blocking하여 비특이적인 반응을 막은 후 0.01 M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.3)를 이용하여 p-IgG를 1:500의 비율로 희석하고 50 µL씩 분주하여 반응시켰다. 그 다음 0.01 M PBS로 2차 항체를 1:40,000 비율로 희석하여 100 µL씩 분주하였다. OPD(o-phenylenediamine, Sigma Chemical Co.) 용액으로 30분 동안 반응시키고 2 M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 ELISA reader(Model 550, Bio-rad, USA)의 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 단계별 반응조건은 37°C에서 2시간이고 각 단계가 끝날 때마다 0.01 M PBST[phosphate buffered saline containing 0.1%(v/v) tween 20]용액으로 4회 수세하였다.

SDS-PAGE

물리적 처리에 의한 PSA의 변화를 알아보기 위해 Laemmli(1970)의 방법을 사용하여 SDS-PAGE(15% separating gel, 4.5% stacking gel)를 실시하였다. 시료, sample buffer(16 mM Tris-HCl; pH 8.0, 6.2 mM EDTA, 31% glycerol, 3.1% SDS) 및 2-mercaptoethanol을 혼합한 후 끓는 물에서 2분간 가열하였다. BPB 용액(0.1% bromophenol blue, 50% glycerol)을 가한 후 냉동보관하며 전기영동에 사용하였다. 전기영동 후 gel은 CBB 용액(50% methanol, 10% acetic acid, 0.1% coomassie brilliant blue R-250)으로 1시간 동안 염색하고, 탈색액(5% methanol, 7% acetic acid)을 이용하여 탈색하였다. 표준분자량 marker(Protein marker, BioLab, USA)의 분자량별 standard는 insulin B와 A chain (2.3 kDa and 3.4 kDa), aprotinin(6.5 kDa), lysozyme(14 kDa), trypsin inhibitor(20 kDa), triosephosphate isomerase (26 kDa), lactate dehydrogenase(36 kDa), MBP2(42 kDa), glutamic dehydrogenase(55 kDa), serum albumin(66 kDa), phosphorylase b(97 kDa), β-galactosidase(116 kDa), MBP-β-galactosidase(158 kDa), myosin(212 kDa)을 이용하였다.

Immunoblotting

전기영동이 끝난 gel은 Towbin 등(1979)의 방법으로 methanol-activated polyvinylidene difluoride(PVDF) mem-

brene에 전사하였다. 150 mA에서 5시간 동안 전사 후 비특이적인 반응을 막기 위하여 각 strip을 3% gelatin으로 1시간 동안 실온에서 blocking시켰다. 1% gelatin을 사용하여 p-IgG는 1:500의 비율로 희석한 후 실온에서 3시간 30분 동안 반응시키고 TBST[tris buffered saline(pH 7.5) containing 0.1% tween 20(v/v)]로 3회 세척하였다. TBST를 사용하여 1:1,000의 비율로 희석시킨 2차 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세척하였으며, DAB(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma Chemical Co.) 용액을 기질로 사용하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

Ci-ELISA의 표준곡선

Coating 항원과 1차 항체인 goat p-IgG를 각각 10 및 2 µg/mL의 농도로 희석한 후 표준곡선을 그렸을 때 p-IgG와 반응하는 PSA의 농도는 다음의 식으로 구할 수 있었다.

$$x = e^{\left(\frac{2.7025 - y}{0.5391}\right)}$$

x = p-IgG와 반응하는 PSA의 농도

y = absorbance value

P-IgG를 사용한 ELISA에서는 PSA를 1.563에서 100 µg/mL의 범위로 희석하였을 때 PSA를 검출할 수 있었다(Fig. 1).

가열 및 가압가열 처리에 의한 돼지고기의 항원성 변화
돼지고기를 60°C에서 60분, 70°C에서 25분, 80 및 100°C에서 각각 20분간 처리한 후 ci-ELISA를 실시하였다. 그

Fig. 1. Standard curve of goat p-IgG to PSA by ci-ELISA. PSA was used as a coating antigen. Goat p-IgG was used for capturing PSA was serially diluted from 200 to 0.195 µg/mL.

결과, 60과 70°C 처리구는 약 110% 정도의 높은 결합력을 유지하였지만, 80과 100°C 처리구는 p-IgG와의 결합력이 약 12 및 9% 정도로 크게 감소하였다(Fig. 2). 가열처리에 의한 돼지고기 serum albumin의 변화를 알아보기 위해서 SDS-PAGE를 실시하였다(Fig. 3a). 돼지고기를 60과 70°C로 가열처리한 경우 무처리구와 비교 시 65 kDa 해당하는 PSA band의 강도가 더욱 증가하였지만, 80과 100°C 처리구는 PSA band의 강도가 많이 약화되었다. Immunoblotting을 실시한 결과에서도 60과 70°C 처리구의 PSA band는 p-IgG와 반응하였지만 80과 100°C 처리 시에는 p-IgG와 반응하지 않았다(Fig. 3b).

돼지고기를 게이지압 1 kg/cm², 121°C에서 5, 10 및 30 분 동안 가압가열 처리한 다음 추출물을 제조하고 1 mg/

mL 농도로 보정한 후 ci-ELISA를 실시하여 PSA의 알레르겐성 변화를 살펴보았다(Fig. 4). 가압가열 5, 10 및 30 분 처리구 모두 PSA와 p-IgG 항체와의 결합력이 각각 9, 8 및 3%로 크게 감소하였으며 처리 시간이 증가함에 따라 PSA의 항원성이 감소하는 경향이 나타나, 가압가열 30 분 처리 시 돼지고기의 항원성이 가장 많이 감소하였음을 알 수 있었다. SDS-PAGE 결과(Fig. 5a)에서는 5, 10 및 30분 처리구의 PSA band가 무처리구와 비교 시 거의 소실되었으며, immunoblotting 결과에서도 가압가열 처리구 모두 p-IgG 항체와 반응하지 않아 ci-ELISA 및 SDS-PAGE 결과와 일치함을 확인하였다(Fig. 5b).

식품에 대한 가열처리는 알레르겐성을 변화시키기도 하는데 이는 식품 항원의 종류 및 처리 조건에 따라 그 양

Fig. 2. Binding ability of goat p-IgG to pork extracts treated with heat. Binding ability = $B_t/B_0 \times 100$. B_t ; binding ability of pork extracts treated with heat, B_0 ; binding ability of pork extracts.

Fig. 4. Binding ability of goat p-IgG to pork extracts treated with autoclave. Binding ability = $B_t/B_0 \times 100$. B_t ; binding ability of pork extracts treated with autoclave, B_0 ; binding ability of pork extracts.

Fig. 3. SDS-PAGE(a) and immunoblotting(b) of pork extracts treated with heat. Samples are (*) marker (1) PSA, (2) raw pork extracts, (3) 60 min at 60°C, (4) 25 min at 70°C, (5) 20 min at 80°C, (6) 20 min at 100°C.

Fig. 5. SDS-PAGE (a) and Immunoblotting (b) of pork extract treated with autoclave. Samples are (*) marker (1) PSA, (2) raw pork extracts, (3) 5 min at 121°C, (4) 10 min at 121°C, (5) 30 min at 121°C.

상이 매우 다양하게 나타난다(Anderson, 1994; Werfel *et al.*, 1997). 일반적으로 가열처리에 의한 단백질의 변화는 55-70°C에서는 unfolding에 의해 단백질의 4차구조가 가역적으로 변화하며, 70-80°C의 범위에서는 disulfide bond가 파괴되고 90-100°C에서는 단백질의 중합이 나타난다(Davis and Williams, 1998). 주로 단백질의 공유결합 형성과 분해에 관여하는 가열처리와 달리 압력처리는 단백질 분자의 소수성 결합이나 이온결합을 분해시키는데 단백질의 구조가 풀이되면서 단백질의 부피도 감소하며 기능적 특성도 달라진다(Farr, 1990; Rastogi *et al.*, 2007).

본 실험에서는 60과 70°C의 가열처리구의 경우 항체와의 결합력이 다소 증가하였는데 이는 PSA의 unfolding에 의해 내부에 있던 epitope가 드러나 항체와 더욱 잘 결합한 것으로 보인다. 80°C 이상의 가열 처리에 의해 결합력이 크게 감소한 것은 disulfide bond가 관여하는 3차 구조가 변화하여 결과적으로 epitope의 파괴 및 구조적인 변화가 일어난 것으로 생각된다. 121°C의 가압가열 처리는 PSA가 고온과 압력의 영향에 의해 물리적 뿐만 아니라 화학적인 변화도 함께 일어난 것으로 사료된다(Wal, 2003). Flocchi 등(1998)의 연구에서는 우유의 주요 항원인 BSA를 84.5°C에서 20분 동안 열처리한 후 IgE-immunoblot을 실시한 결과 BSA의 band가 항체와 반응하지 않았다고 하였으며 높은 온도에서 열처리 시간을 길게 할 경우 BSA의 protein matrix가 파괴되어 알레르겐성이 감소한다고 보고하였다. 또한, Han 등(2006)의 연구에서는 1.3 atm, 120°C에서 10분간 가압가열 처리한 우유 추출물의 경우 주요 항원인 BSA와 BGG의 알레르겐성이 크게 감소하였다고 보고하여 본 연구결과와 일치함을 확인하였다.

Microwave 처리에 의한 돼지고기의 알레르겐성 변화

Microwave 처리에 의한 돼지고기의 알레르겐성 변화를 살펴보기 위하여 1, 5 및 10분간 microwave 처리한 돼지고기를 추출한 후 ci-ELISA를 실시하였다(Fig. 6). 1분 동안 microwave 처리한 경우에는 p-IgG와의 결합력이 약 80% 정도로 높게 유지 되었지만 5와 10분 처리 시에는 12 및 10% 정도로 결합력이 크게 감소하였다. Microwave 처리에 의한 돼지고기 추출물 중의 PSA 변화를 SDS-PAGE로 살펴본 결과(Fig. 7a), microwave 1분 처리 시에는 무처리구와 비교했을 때 PSA의 band가 약간 약화되었으나, 5와 10분 처리 시에는 PSA band의 강도가 크게 감소하였다. Immunoblotting 결과(Fig. 7b)에서도 microwave 1분 처리구는 p-IgG 항체와 반응하였지만 5와 10분 처리구의 PSA band는 항체와 반응하지 않았다.

한편, microwave 처리에 의해 발생하는 열의 작용을 배제하기 위하여 돼지고기가 든 시험관 주위에 얼음물을 채워 microwave 처리한 후 ci-ELISA를 실시하였다. 그 결과, 1과 5분 처리구는 p-IgG와 약 95%, 10과 20분 처리

Fig. 6. Binding ability of goat p-IgG to pork extracts treated with microwave. Binding ability = $B_t/B_0 \times 100$. B_t ; binding ability of pork extracts treated with microwave, B_0 ; binding ability of pork extracts.

Fig. 7. SDS-PAGE (a) and Immunoblotting (b) of pork extracts treated with microwave. Samples are (*) marker (1) PSA, (2) raw pork extracts, (3) 1 min, (4) 5 min, (5) 10 min.

구는 각각 83 및 78%로 높은 결합력을 유지하였다(Fig. 8). SDS-PAGE 결과(Fig. 9)에서도 낮은 온도에서 1, 5, 10 및 20 분간 microwave 처리한 경우는 PSA band가 크게 변화하지 않아 열의 작용이 배제된 microwave 처리는 돼지고기의 알레르겐성을 변화시키는 데 효과적이지 않음을 알 수 있었다.

전자레인지(microwave oven)는 내부의 전자파 발진장치인 마그네트론에서 전파를 방출하는데 이 전파의 진동수는 2,450 MHz이다. 전자레인지에서 나오는 전파의 진동수는 물의 진동수와 같기 때문에 물 분자가 이 전파의 에너지를 흡수하여 공진 현상이 일어나게 되며, 이 때문에 물 분자끼리 서로 충돌을 하여 마찰열이 생기게 된다(Sung, 2002). 본 실험에서 microwave 5분과 10분 처리에 의한 돼지고기의 알레르겐성 감소는 물 분자의 진동에 의하여

Fig. 8 Binding ability of goat p-IgG to pork extracts treated with microwave at low temperature. Binding ability = $B_t/B_0 \times 100$. B_t ; binding ability of pork extracts treated with microwave at low temperature, B_0 ; binding ability of pork extracts.

Fig. 9. SDS-PAGE of pork extracts treated with microwave at low temperature. Samples are (*) marker (1) PSA, (2) raw pork extracts, (3) 1 min, (4) 5 min, (5) 10 min (6) 20 min.

발생한 열로 인해 단백질이 변성되어 나타난 것으로 사료된다. 하지만 얼음물을 사용하여 microwave 처리를 한 경우는 돼지고기의 내외부가 얼음물로 인해 가열되지 못하였기 때문에 항원성에 영향을 끼치지 못한 것으로 생각된다. Lee 등(2000)은 11종의 수산식품 중 PCA test를 실시하여 낙지, 조기, 홍어 및 새우를 allergy가 있다고 판정하였으며, 가열의 효과가 있는 microwave 처리가 낙지, 조기, 홍어 및 새우의 알레르겐성을 현저히 감소시킨다고 보고하였다. 또한, Kim 등(2008)의 연구에서도 낮은 온도에서 microwave 처리한 경우에는 PSA가 항체와 높은 결합력을 유지하였지만 발생한 열이 그대로 작용한 microwave 처리에서는 PSA의 알레르겐성을 감소시켜 본 연구와 일

치함을 확인하였다.

초음파 처리에 의한 돼지고기의 항원성 변화

돼지고기 추출물에 5, 10, 30 및 60분 동안 초음파 처리한 후 ci-ELISA를 이용하여 항원성 변화를 살펴본 결과 (Fig. 10), 초음파를 5와 10분 동안 처리한 경우에는 약 80%, 30과 60분 처리 시에는 약 60%로, 초음파 처리구 모두 60% 이상의 높은 결합력을 유지하였다. SDS-PAGE 결과(Fig. 11)에서는 5와 10분 동안 초음파 처리한 돼지고기의 PSA band가 무처리구와 비교 시 큰 차이를 나타내지 않았으나, 30과 60분 처리 시에는 PSA band가 조금 약화되었다. 특히 60분 처리구는 PSA band 이외에도 42 kDa과 97 kDa에 해당하는 단백질의 강도가 조금 감소되었다.

Fig. 10. Binding ability of goat p-IgG to pork extracts treated with sonication. Binding ability = $B_t/B_0 \times 100$. B_t ; binding ability of pork extracts treated with sonication, B_0 ; binding ability of pork extracts.

Fig. 11. SDS-PAGE of pork extracts treated with sonication. Samples are (*) marker (1) PSA, (2) raw pork extracts, (3) 5 min, (4) 10 min, (5) 30 min (6) 60 min. Arrows indicate the position of 97 and 42 kDa band respectively.

초음파를 액체매질 속에서 조사하면 공동화로 인해 미세한 기포가 발생하며, 기포가 충분히 성장하여 폭발적으로 파열하는 진행과정을 거치게 된다. 그런데 기포가 성장하는 과정에서 수용액의 증기가 기포 내로 유입되고, 기포 내에 에너지가 축적되어 기포 내부의 온도와 압력이 높아진다. 따라서 기포가 폭발적으로 파열될 때 기포 내의 고온고압가스가 순간적으로 방출되면서 충격파가 발생하게 된다(Lee *et al.*, 2006). 본 실험에서 초음파 처리가 PSA의 항원성에 큰 영향을 주지 못한 것은 초음파로 인해 발생한 열이 얼음물에 의해 배제되었기 때문으로 사료된다. 하지만 초음파를 비교적 장시간 발생시킨 30과 60분 처리구는 PSA의 항원성이 조금 감소하였는데, 이는 초음파로 인해 중합체 분해 및 공동효과 등(Kim *et al.*, 1999)이 나타나 PSA의 구조가 다소 변화한 것으로 생각된다. Zhenxing 등(2006)의 연구에서도 50°C에서 초음파 처리하였을 때는 새우의 알레르겐성이 감소하였지만 0°C에서 초음파 처리한 경우에는 새우의 알레르겐성이 크게 변화하지 않았다고 보고하여 열을 병용하지 않은 초음파 처리는 식품의 알레르겐성을 감소시키는데 효과적이지 않음을 알 수 있었다.

감마선 처리에 의한 돼지고기의 항원성 변화

돼지고기에 1, 3, 10 및 20 kGy의 감마선을 처리한 후 ci-ELISA를 실시함으로써 돼지고기의 항원성 변화를 살펴 보았다(Fig. 12). 1, 3, 10 및 20 kGy의 선량으로 감마선 조사한 돼지고기는 p-IgG와의 결합력이 약 100% 이상으로 무처리구 보다 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 감마선 3, 10 및 20 kGy 처리구가 1 kGy 처리구보다 결합력이 조금 더 증가하였다. Zhenxing 등(2007)에 의하면 새우 근육에 감마선을 조사한 결과, 낮은 선량(3-7 kGy)에서

Fig. 12. Binding ability of goat p-IgG to pork extracts treated with gamma irradiation. Binding ability = $B_t/B_0 \times 100$. B_t ; binding ability of pork extracts treated with gamma irradiation, B_0 ; binding ability of pork extracts.

결합력이 증가되었다고 보고하였다. 이는 감마선에 의해 생성된 radical에 의해 새우의 알러젠이 노출 되었을뿐만 아니라, 알러젠과 다른 근육 성분들과의 교차 반응에 기인한 것으로 유추하였다. 하지만, 15 kGy에서는 알레르겐성 감소를 보고하였으나 본 연구결과에서는 고선량인 20 kGy에서도 항체와의 결합력이 감소하지 않았다. 이는 알러젠에 따라 단백질의 구조가 다르며, 식품에는 다양한 성분들이 함유되어 있어 감마선에 대한 감수성이 다르게 나타나기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 돼지고기의 IgG 결합력 증가는 감마선 조사 시 생성된 radical에 의해 PSA의 IgG 결합부위의 노출로 인한 것으로 보인다. 한편, aqueous solution 상태에서의 ovalbumin(Byun *et al.*, 2004), porcine serum albumin(Kim, 2007) 및 tropomyosin(Byun *et al.*, 2000)에 감마선 조사 시 알레르겐성이 상당히 감소하였다는 보고와 비교할 때 본 연구결과는 상반된 결과를 보였다. 그 이유는 전리 방사선은 물 분자를 이온화시켜 자유 hydroxyl radical 및 hydrated electron이 생성되며 조사에 의해 생성된 자유 radical은 단백질을 공격하여 3, 4차 구조를 변성시키는데(Lee and Byun, 2003), 식품에도 수분이 존재하고 있어 감마선 조사 시 자유 radical이 생성되어 알러젠이 영향을 받지만, aqueous solution 상태에서는 감마선 조사 시 단백질에 대해 물 분해산물인 자유 radical의 영향이 더욱 강하게 나타나기 때문이다. 또한 이전 문헌 결과에서는 단일 성분에 감마선을 조사한 결과로서, 돼지고기에는 알러젠인 PSA 이외에도 다양한 성분이 존재하기 때문에 항원성에 대한 감마선의 작용에 다른 성분들이 영향을 미쳤기 때문으로 사료된다. 감마선 처리 후 돼지고기의 단백질 변화를 SDS-PAGE로 알아본 결과(Fig.

Fig. 13. SDS-PAGE of pork extracts treated with gamma irradiation. Samples are (*) marker (1) PSA, (2) raw pork extracts, (3) 1 kGy, (4) 3 kGy, (5) 10 kGy (6) 20 kGy.

13), PSA band는 감마선 조사 선량에 따른 변화가 없어 돈육에 직접 조사 시에는 감마선에 의한 PSA의 구조 변화가 거의 없는 것으로 보인다. 감마선 조사 시 단백질의 변화에 대한 이전의 연구 결과를 살펴보면, Yook 등(1998)의 연구결과에서는 감마선을 직접 돈육에 40 kGy까지 조사하여도 전 단백질이 거의 분해되지 않았으며, 분리된 단백질 중 serum albumin인 66 kDa의 band도 감마선에 의한 변화가 없었다. Lee 등(1999)은 지방과 근막을 제거한 돈육 등심을 진공 및 합기 포장한 후 1, 3, 5 및 10 kGy 선량으로 감마선 조사한 결과, 감마선 조사에 의한 근섬유 단백질과 근혈장 단백질의 전기영동적 분리 형태의 차이점은 크게 나타나지 않았다고 보고하였다. 또한, Zhenxing 등(2007)에 의하면, 새우의 주요 알레르겐인 Pen a 1은 aqueous solution 상태에서는 조사선량의 증가에 따라 band의 강도가 감소하였지만, 새우 근육에 조사 시는 감마선에 의한 변화가 없다고 하였다. 본 연구 결과에서도 돼지고기에 조사 시에는 항원성의 감소에는 효과가 없음이 밝혀졌으며, 효과적으로 알레르겐성을 감소시키기 위해서는 다른 물리적 처리와 병용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 돼지고기에 여러 가지 물리적 처리를 실시한 후 PSA의 항원성 변화를 살펴봄으로써 돼지고기의 알레르겐성 감소에 가장 효과적인 처리 조건을 찾아 항원성이 저감된 돼지고기 제품 개발에 적용하고자 하였다.

먼저, 돼지고기에 가열, 가압가열, microwave, 초음파 및 감마선을 처리하고 주요 항원인 PSA를 추출하였다. 그 후, ci-ELISA, SDS-PAGE 및 immunoblotting을 실시하여 돼지고기의 항원성 변화를 살펴보았다. 80과 100°C에서 각각 20분간 가열처리 했을 때와 121°C에서 5, 10 및 30 분 가압가열 처리한 경우 PSA와 IgG 항체와의 결합력이 약 10% 이하로 크게 감소하였으며, 특히 가압가열 30분 처리 시에 결합력이 5% 이하로 가장 많이 감소하였다. SDS-PAGE와 immunoblotting 결과에서도 무처리구에서 강하게 보였던 PSA band가 80, 100 및 121°C 처리에 의해 소실되고 항체와 반응하지 않았다. 또한, microwave 처리 시에는 5분과 10분 처리구의 경우 IgG와의 결합력이 각각 12% 및 10% 정도로 많이 감소하였지만 microwave 1 분 처리와 낮은 온도에서 1, 5, 10 및 20분간 처리한 경우에는 약 80% 이상의 높은 결합력을 유지하였다. 초음파(5, 10, 30 및 60분) 및 감마선 처리(1, 3, 10 및 20 kGy)에 의한 돼지고기의 항원성 변화를 알아본 결과에서는 초음파 처리구 전체에서 여전히 높은 결합력을 유지하였으며 SDS-PAGE에서도 초음파 처리구의 PSA band는 무처리구와 비교 시 크게 약화되지 않았다. 감마선 처리구는

모든 선량에서 IgG와의 결합력이 무처리구 보다 약 10-15% 정도 증가하였음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 낮은 온도에서 microwave 및 초음파 처리한 경우와 감마선 처리한 경우는 돼지고기의 항원성을 감소시키는데 큰 영향을 주지 못하였지만, 80°C 이상의 가열처리는 항원성을 크게 감소시켰다. 특히, PSA는 가압가열처리 시 가장 크게 변화하였으므로 본 연구에 사용된 가압가열 처리조건을 저 알레르기 돼지고기 식품 개발에 응용할 경우 긍정적인 결과를 얻을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ahn, B. I., and Jo, Y. D. (2009) Analysis of the impacts of Korea-US FTA in the pork market in Korea. *J. Agri. Life Sci.* **43**, 55-64.
- Anderson, J. A. (1994). Milestones marking the knowledge of adverse reactions to food in the decade of the 1980s. *Ann. Allergy* **72**, 143-154.
- Byun, M. W., Kim, J. H., Lee, J. W., Park, J. W., Hong, C. S., and Kang, I. J. (2000) Effects of gamma radiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J. Food Prot.* **63**, 940-944.
- Byun, M. W., Lee, J. W., Seo, J. H., Kim, J. H., Jo, C., Kim, D. H., and Chung H. W. (2004) Changes of the immune reactivities of antibodies produced against gamma-irradiated antigen. *Radiat. Phys. Chem.* **71**, 125-127.
- Chung, H. J., Park, J. H., Kim, J. H., Kim, Y. O., Chung, S. T., Kim, J. H., Cho, E. D., Cho, D. H., Noh, G. W., and Kim, D. S. (2001) Identification of allergens in pork meat. *J. Pharm. Korea* **45**, 39-45.
- Davis, P. J. and Williams, S. C. (1998) Protein modification by thermal processing. *Allergy* **53**, 102-105.
- Donnay, C., Barderas, M. C., Kopferschmitt-Kubler, G., and de Blay, F. (2006) Sensitization to pig albumin and γ -globulin responsible for occupational respiratory allergy. *Allergy* **61**, 143-147.
- Ehn, B., Ekstrand, B., Bengtsson, U., and Ahlsted, S. (2004) Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen β -lactoglobulin. *J. Agri. Food Chem.* **52**, 1398-1403.
- Farr, D. (1990) High pressure technology in food industry. *Trends in Food Sci. Technol.* **1**, 14-16.
- Fiocchi, A., Restani, P., and Riva, E. (2000) Beef allergy in children. *Nutrition* **16**, 454-457.
- Fiocchi, A., Restani, P., Riva, E., Mirri, G. P., Santini, I., Bernardo, L., and Galli, C. L. (1998) Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin. *Allergy* **53**, 798-802.
- Hah, K. H., Ahn, C. N., Joo, S. T., Park, G. B., Sung, N. J., Park, K. H., Kim, I. S., Jin, S. K., and Chung, K. Y. (2005) Physical characteristics of seasoning pork during aging at cold temperature. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **25**, 397-

- 402.
13. Han, G. D., Fan, J. P., and Suzuki, A. (2006) Changes of SDS-PAGE pattern and allergenicity of BSA and BGG in beef extract treated with heat and high pressure. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 594-599.
14. Jeong, E. J. (1995) A study on the allergenicity of milk protein. *Korean J. Food Nutr.* **8**, 79-87.
15. Julia, S., Sanchez, L., Perez, M. D., Lavilla, M., Conesa, C., and Calvo, M. (2007) Effect of heat treatment on hen's egg ovomucoid: An immunochemical and calorimetric study. *Food Res. Int.* **40**, 603-612.
16. Kang, K. O., Lee, J. W., Jo, C., Yook, H. S., and Byun, M. B. (2002) Changes of allergenicity and conformational structure of egg ovomucoid by gamma irradiation in the basic condition. *J. Food Sci. Nutr.* **7**, 52-56.
17. Kim, K. B. W. R. (2007) Changes in allergenicity of porcine serum albumin by physical treatment. MS thesis, Pukyong National Univ., Busan, Korea.
18. Kim, K. B. W. R., Kim, S. J., Lee, S. Y., Song, Y. J., and Ahn, D. H. (2008) Changes in allergenicity of porcine serum albumin by microwave, sonication and high hydrostatic pressure. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 499-504.
19. Kim, S. J., Kim, K. B. W. R., Song, E. J., Lee, S. Y., Yoon, S. Y., Lee, S. J., Lee, C. J., and Ahn, D. H. (2009) Effect of digestive enzymes on the allergenicity of autoclaved market pork sausages. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **29**, 238-244.
20. Kim, S. M., Park, J. G., Kim, K. B. W. R., Lee, J. W., Byun, M. W., Park, S. M., and Ahn, D. H. (2006) Study on the changes in allergen and allergenicity originated from shrimp by physical treatments. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 990-996.
21. Kim, S. M., Park, S. M., Choi, H. M., and Lee, K. T. (1999) Optimal processing parameters of low molecular weight carageenan by ultrasound. *J. Korean Fish. Soc.* **32**, 495-500.
22. Kim, W. K. (2006) Diagnosis and treatment of food allergy in children. *Pediatr. Allergy Respir. Dis.* **16**, 274-283.
23. Korea Food and Drug Administration (2008) Labeling standards for foods etc. KFDA notification No. 2008-31 (Amendment on Jun. 17, 2008) Available from: http://www.kfda.go.kr/poen_content/data/food_view.php. Accessed Dec. 1, 2008.
24. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
25. Lee, J. W. and Byun, M. W. (2003) Food irradiation technology and the structural changes of food allergen by irradiation. *Korean J. Asthma Allergy Clin. Immunol.* **23**, 16-23.
26. Lee, B. O., Chang, O. K., and Oh, D. K. (2000) Evaluation of allergenicity for fish and method for reduction of allergenicity by food technological treatment. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **20**, 114-124.
27. Lee, J., Lim, K. T., Hong, J. H., Lee, Y. B., Rhee, C. O., and Chung, J. H. (2006) Effects of ultrasound stimuli on acceleration of brown rice germination. *J. Biosystems Eng.* **31**, 506-513.
28. Lee, J. W., Park, J. H., Kim, C. J., and Shin, H. K. (1998) Application of competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Ci-ELISA) for monitoring the degree of frozen denaturation of bovine myosin. *Int. J. Food Sci. Technol.* **33**, 401-410.
29. Lee, J. W., Yook, H. S., Kim, S. A., Sohn, C. B., and Byun, M. W. (1999) Effect of gamma irradiation on the physicochemical properties of pork loin. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 705-711.
30. Li, Z. X., Lin, H., Cao, L. M., and Jameel, K. (2006) Effect of high intensity ultrasound on the allergenicity of shrimp. *J. Zhejiang Uni. B. Sci.* **7**, 251-256.
31. Mamikoglu, B. and Pocahontas, A. (2005) Beef, pork, and milk allergy (cross reactivity with each other and pet allergies). *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **133**, 534-537.
32. Moon, E. K., Bae, H. C., and Nam, M. S. (2007) The relationship between food allergen sensitization and allergic disease in childhood. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **27**, 337-344.
33. Nogami, N., Matsuno, M., Hara, T., Joh, T., Nishiumi, T., and Suzuki, A. (2006) Elimination of the allergenicity of food protein by high pressure. *Rev. High Pressure Sci. Technol.* **16**, 11-16.
34. Oppenheimer, J. J., Nelson, H. S., and Bock, S. A., Christensen, F., and Leung, D. Y. (1992) Treatments of peanut allergy with rush immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **90**, 256-262.
35. Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., and Knorr, D. (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **47**, 69-112.
36. Seo, J. H., Kim, J. H., Lee, J. W., Yoo, Y. C., Kim, M. R., Park, K. S., and Byun, M. W. (2007) Ovalbumin modified by gamma irradiation alters its immunological functions and allergic responses. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 464-472.
37. Sung, S. H. (2002) Study on the drying method of velvet antler using microwave oven. *J. Lives. Hous. Env.* **8**, 177-182.
38. Towbin, H. T., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
39. Wang, C. H., Kou, S. K., and Chen, H. L. (2002) Porcine serum albumins sandwich ELISA for determining the cooking temperature of cured ground pork. *Taiwanese J. Agr. Chem. Food Sci.* **40**, 197-204.
40. Wal, J. M. (2003) Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy* **58**, 727-729.
41. Werfel, S. J., Cooke, S. K., and Sampson, H. A. (1997) Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 293-300.
42. Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Richardson, R. I., and Sheard, P. R. (1999) Manipulating meat quality and composition. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 363-370.
43. Yook, H. S., Kim, M. R., Kim, J. O., Lim, S. I., and Byun, M. W. (1998) Effects of γ -irradiation on meat proteins. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 407-412.
44. Zeece, M., Huppertz, T., and Kelly, A. (2008) Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin.

- lin. *Innov. Food Sci. Emerg.* **9**, 62-69.
45. Zhenxing, L., Caolimin, L., and Jamil, K. (2006) Reduction of allergenic properties of shrimp (*Penaeus vannamei*) allergens by high intensity ultrasound. *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 639-644.
46. Zhenxing, L., Hong, L., Limin, C., and Jamil, K. (2007) The influence of gamma irradiation on the allergenicity of shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Food Eng.* **79**, 945-949.
-
- (Received 2009.7.22/Revised 1st 2009.9.12, 2nd 2009.10.6, 3rd 2009.10.12, 4th 2009.11.17/Accepted 2009.11.18)