(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0055565
(43) 공개일자 2016년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23B 7/155 (2006.01) *A23L 7/10* (2016.01)
C12N 9/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0155529
(22) 출원일자 2014년11월10일
심사청구일자 2014년11월10일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
오상석
서울특별시 용산구 녹사평대로 168-12 (이태원동)
이채윤
서울특별시 송파구 석촌호수로 169, 118동 1802호 (잠실동, 레이크팰리스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

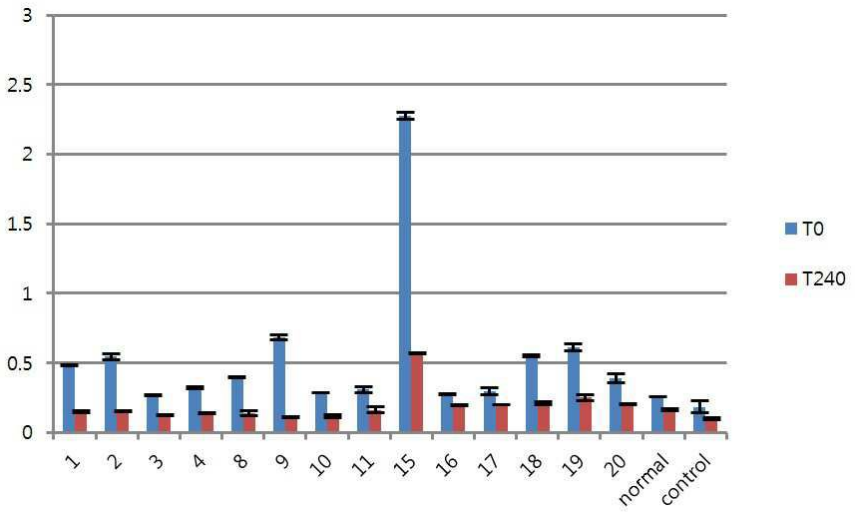
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **초고압처리 및 알칼리 프로테아제 처리를 통한 메밀의 알레르기 항원성 저감 방법**

(57) 요 약

본 발명은 초고압처리 및 알칼리 프로테아제 처리를 통한 메밀의 알레르기 항원성 저감 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게, 메밀을 100 내지 600MPa 의 압력으로 처리하는 단계; 및 상기 압력으로 처리된 메밀에 알칼리 프로테아제(Alkaline protease)를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5b



(72) 발명자

성동은

서울특별시 중구 소공로 35, 102동 2602호 (회현동1가, 남산롯데캐슬아이리스)

이원희

광주광역시 광산구 금봉로 36, 601동 704호 (소촌동, 대덕무지개아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395036045
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	비가열처리 및 가수분해에 의한 메밀 신소재 개발
기 여 율	1/1
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2013.01.01 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

메밀을 100 내지 600MPa 의 압력으로 처리하는 단계; 및

상기 압력으로 처리된 메밀에 알칼리 프로테아제(Alkaline protease)를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는,

알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메밀을 100 내지 600MPa 의 압력으로 처리하는 단계는 10 내지 25℃에서 1 내지 30분 동안 수행하는 것인, 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시키는 단계는, 메밀을 기준으로 알칼리 프로테아제를 200 내지 400 U/kg 첨가하는 것인, 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시키는 단계는 1분 내지 18시간 동안 수행하는 것인, 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시키는 단계는 pH 6.5 내지 8.5, 및 온도 55 내지 70℃의 조건 하에서 수행되는 것인, 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 메밀은 통메밀, 메밀 추출물 또는 분획물, 메밀 가루, 메밀 반죽물, 메밀 건조물 또는 농축물 형태인, 제조 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된, 알레르기 항원성이 저감화된 메밀.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀을 포함하는 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초고압처리 및 알칼리 프로테아제 처리를 통한 메밀의 알레르기 항원성 저감 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게, 메밀을 100 내지 600MPa 의 압력으로 처리하는 단계; 및 상기 압력으로 처리된 메밀에 알칼리 프로테아제(Alkaline protease)를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 메밀은 마디풀과(Polygonaceae family)에 속하는 일년생 초본으로 식물 분류학적으로는 쌀, 밀, 옥수수와 같은 곡물이 속하는 화본과(Gramineae family) 식물과 구분된다. 메밀의 품종은 다양하나 주로 보통메밀(Fagopyrumesculentum)과 달단메밀(Fagopyrum tataricum)이 메밀 식품의 주원료로 많이 사용된다.

[0003] 메밀은 식물학적 특성상 생육기간이 짧고 척박한 땅에서도 재배가 가능하며 다른 작물의 작황이 좋지 않을 때 대체 작물로서의 활용이 가능하여 전 세계적으로 폭넓게 재배되고 있다. 또한 고혈압, 심혈관 질환 등을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 다양한 연구들을 통해 영양학적 가치가 과학적으로 입증되었으며, 독특한 맛과 향이 있어 과자류, 빵류, 당과류, 국수류 및 죽류 등 식품으로 많이 이용되고 있다.

[0004] 그러나 메밀은 알레르기 항원성이 높은 식품으로 알려져 있다. 일본에서 1990년대에 92680명의 어린이를 대상으로 메밀 알레르기를 연구한 결과 194명(약 0.22%)에게서 알레르기 증상이 관찰되었는데, 이 중 37.3%가 두드러기 증상을 보였고, 26.5%가 호흡곤란 증세를 보였으며, 3.9%는 아낙필락시스 증세을 나타내었다. 또한, 1960년대에 실행한 임상 보고에 따르면 메밀 알레르기에 대해 169 사례를 연구한 결과 86%가 어린이였으며, 식품 알레르기와 호흡기 알레르기 증상을 보였다. 가장 흔한 증상은 메밀 천식(82%)이었고, 18 사례(11%)가 아낙필락시스 증상을 보였다 (Jeong-Lim Kim et al., Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat, Prague 2004). 국내에서는 502명의 소아알레르기 환자를 대상으로 메밀 알레르기 피부 시험을 시행한 결과 3.8%가 강양성 반응을 보여 메밀이 식품 항원 중 5위를 차지하였다 (손대열 등, 한국식품과학회지 제34권 제5호 제751-934면, 2002).

[0005] 메밀 알레르기는 식품 중에 들어 있는 아주 소량의 유발물질에 의해서도 일어날 수 있고 또한 현재 메밀 알레르기를 치료할 수 있는 마땅한 방법들이 알려져 있지 않으므로, 이를 예방하기 위해서는 메밀 관련 식품의 섭취를 엄격하게 피하는 것이 최선의 방안이다. 그러나 식품의 부정확한 표시나 가공식품의 제조과정 중 알레르기 유발물질의 비의도적 혼입에 의해 소비자들이 항상 알레르기 유발물질을 확인하고 섭취를 피하기는 현실적으로 쉽지 않다. 따라서 메밀에 포함된 알레르기 유발물질을 분해, 제거 또는 약화시킨 알레르기 저감화 메밀 식품 소재에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다.

[0006] 메밀 알러젠에 대한 연구는 아시아 지역에서 많이 이루어지고 있으며 주로 일본에서 많은 연구가 진행 중에 있지만, 다른 식품 알러젠에 비해서는 알려진 바가 많지 않다. 주요 메밀 알러젠으로는 10, 16, 19, 24 kDa이 알려져 있으며 펩신에 분해 저항력을 가진 16 kDa이 현재 주요 알러젠이라고 언급하는 추세이다 (Tanaka et al., Int Arch Allergy Immunol. 129(1):49-56, 2002). 현재 ALLERGEN NOMENCLATURE에 등재되어 있는 메밀 알러젠은 16 kDa (Fag e 2)와 19 kDa (Fag e 3)의 두 종류이다.

[0007] 지금까지의 보고된 메밀 알러젠 저감화 연구로는 곰팡이 효소를 이용하는 방법 (Gong G. et al., Food industry 2004-05-006), 알러젠 성분이 많은 배아를 제거하는 방법 (Licen M. et al., Proceedings of the international symposium on buckwheat, 2007), 아미노산 서열 변이 방법 (Satoh R. et al., Biol Pharm Bull. 31(6):1079-85, 2008), 사상균 스타터나 사상균을 직접 첨가하고 발효시키는 방법 (일본 특허공개 제2005-218362호) 등이 알려져 있다. 그러나 균을 직접 접종하는 경우 알러젠 뿐만 아니라 메밀 내 다른 활성 성분까지 분해 또는 변성되거나 발효물의 물성이 크게 변화할 수 있고, 배아를 제거하는 경우 메밀의 영양학적 효능이 크게 떨어질 수 있으며, 아미노산 변이의 경우 안정성의 검증이 필요한 문제가 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 보다 효과적이고 안전한 메밀 알레르기 저감화 기술을 제공하고자 노력한 결과, 메밀에 초고압처리 및 알칼리 프로테아제 처리를 하는 경우, 메밀 내 알러젠 단백질을 아미노산과 같은 저분자까지 효율적으로 분해하면서도 메밀 고유의 건강 기능성 활성 성분이나 물성을 그대로 유지할 수 있어 건강 식품 소재로의 폭넓은 활용이 가능하다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 메밀의 알레르기 항원성을 저감하기 위하여, 메밀을 100 내지 600MPa 의 압력으로 처리하는 단계; 및 상기 압력으로 처리된 메밀에 알칼리 프로테아제(Alkaline protease)를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 메밀에 대하여 초고압처리 후 항원성(immunogenicity)을 측정하였다. 그 결과, 압력을 가하는 시간이 증가함에 따라 메밀의 항원성이 감소하는 것을 확인하였다(실험결과 1).

[0011] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 메밀에 알칼리 프로테아제를 농도, 시간별로 처리한 후 항원성을 측정하였다. 그 결과, 알칼리 프로테아제의 농도에 비례하여 메밀의 항원성이 우수하게 감소하는 것을 확인하였다(실험결과 2).

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 실시예에서는 메밀을 초고압처리 후 알칼리 프로테아제를 처리하여 항원성을 측정하였다. 그 결과, 초고압처리 및 알칼리 프로테아제를 각각 단독으로 처리한 경우보다 우수하게 메밀의 항원성이 감소하는 것을 확인하였다(실험결과 4).

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 초고압처리 후 알칼리 프로테아제를 처리한 메밀에 대하여 사람 혈청을 이용하여 알레르기 항원성(allergenicity)을 측정하였다. 그 결과, 모든 혈청에서 알레르기 항원성이 크게 감소하였고, 메밀에 매우 높은 반응성을 보이던 혈청도 알레르기 항원성이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(실험결과 5).

[0014] 또한, 본 발명에서는 알칼리 프로테아제 이외의 다른 단백질 분해효소인 프로타맥스를 메밀에 처리한 후 메밀의 항원성 및 알레르기 항원성을 측정하였다. 그 결과, 메밀의 항원성 및 알레르기 항원성은 프로타맥스에 의하여 거의 감소하지 않았으며, 저항성을 나타내는 것을 확인하였다(실험결과 3 및 6).

[0015] 이와 같이, 본 발명과 같이 메밀에 초고압처리 및 알칼리 프로테아제를 처리하는 경우 메밀의 알레르기 항원성이 우수하게 감소되는 것을 확인하였고, 본 발명의 제조방법에 의하여 제조된 메밀을 이용하여 알레르기 항원성이 저감화된 메밀 식품의 제조에도 활용될 수 있음을 입증하였다.

[0016] 이하에서, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0017] 본 발명은 하나의 양태로, 메밀을 100 내지 600MPa의 압력으로 처리하는 단계; 및 상기 압력으로 처리된 메밀에 알칼리 프로테아제(Alkaline protease)를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조 방법에 관한 것이다.

[0018] 식품 알레르기란 식이 형태로 체내에 들어온 특정의 단백질(알러젠)에 대하여 면역계가 과잉으로 반응하여 여러 가지 증상을 일으키는 것을 말한다. 식품 알레르기는 1차 접촉 기관인 소화기와 2차 접촉 기관인 피부, 코, 및 혈관 등 모든 기관에서 급성 또는 만성으로 나타날 수 있으며, 주요 증상으로는 두드러기, 맥관부종, 아토피 피부염의 악화, 설사, 복통 등의 소화기 질환, 천식, 비염 같은 호흡기 질환과 결막염 등이 있으며 이 중 두드러기 같은 피부 질환이 흔하게 나타난다. 이러한 식품 알레르기에 의한 증상이 심각할 경우 사망에까지 이를 수 있다. 국내에서는 계란, 우유, 대두, 메밀과 밀이 5대 알레르기 유발 식품으로 확인되었다.

[0019] 알레젠이 알레르기를 나타내기 위해서는 면역학적으로 활성화된 형태로 위장관에 도달해야 하므로, 이러한 단백질들은 비교적 열처리나 산처리, 단백질 가수분해 등에 저항력을 가지고 있다. 식품 알러젠의 효소적 가수분해에 대한 연구로, Astwood 등의 보고(Nat. Biotechnol. 14:1269-1273, 1996)에 따르면, 대두 단백질인 베타-콘글리시닌과 쿠니츠-트립신 저해제(Kunits-trypsin inhibitor), 우유의 주요 알러젠인 베타-락토글로불린, 땅콩의 Arah 2, 계란의 오브알부민 및 포스비틴은 단백질 가수분해에 대한 강한 저항성을 나타내었다. 이와 같이 식품 알러젠이 물리화학적으로 안정할 수 있는 이유는 수많은 이황화 결합, 올리고머화, 응집 또는 당화 등을 통한 구조적 특징과 IgE 결합 에피톱의 변화 등을 생각해볼 수 있다.

[0020] 본 발명자들은 메밀 알레르기 항원성 저감화 기술과 관련하여, 열이나 장관계 효소인 펩신이나 카이모트립신에 저항성이 있는 것으로 알려진 메밀 알러젠 단백질에 대하여, 비가열처리 기술인 초고압처리를 통하여 메밀의 알

레르기 항원성을 저감화 시킬 수 있음을 확인하였다.

[0021] 초고압처리를 통하여 메밀의 알레르기 항원성을 저감화시키기 위하여, 메밀을 100 내지 600MPa의 압력으로 처리할 수 있는데, 예를 들어, 100MPa 내지 500MPa, 100MPa 내지 500MPa, 300MPa 내지 600MPa, 400MPa 내지 600MPa 또는 600MPa 등의 압력을 처리할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 메밀을 100MPa 이상에서 처리하는 경우, 메밀 내의 단백질이 해리될 수 있고, 400MPa이상에서는 메밀 내의 단백질이 변성될 수 있으므로, 초고압처리를 하여 메밀의 알레르기 항원성 단백질을 분해 또는 변성시켜 항원성을 저감화 시킬 수 있다.

[0022] 또한, 메밀의 알레르기 항원성 단백질은 600MPa의 초고압처리에 의하여 단백질의 비공유결합이 파괴되고 그에 따라 단백질이 변성되고 분해가 촉진됨으로써 알레르기 항원성이 감소되는 것일 수 있다. 또한, 메밀에 대하여 초고압처리를 함으로써, 열처리에 의하여 알레르기 항원성을 감소시키는 기술에 비하여 열에 의한 식품의 질감과 향미 변화 및 영양 성분의 손실을 줄이면서 우수하게 알레르기 항원성을 감소시킬 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명자들은 메밀 알레르기 항원성 저감화 기술과 관련하여 메밀 알러젠의 단백질 가수분해 효소에 대한 저항성에 관한 연구를 하던 중, 메밀이 알칼리 프로테아제에 특이적으로 높은 가수분해되나, 프로타맥스와 같은 다른 종류의 단백질 분해 효소에는 저항성을 나타냄을 확인하게 되었다.

[0024] 따라서, 메밀이 알칼리 프로테아제에 특이적으로 가수분해되므로, 이를 이용하여 알레르기 항원성이 저감화된 메밀 식품 소재를 개발하는 것이 가능하다.

[0025] 본원에서 용어, "알칼리 프로테아제(alkaline protease)"는 알칼리성 범위인 pH 6 내지 10, 예를 들어 pH 7 내지 9, 7 내지 8, pH 8 내지 9, pH 6.5 내지 8.5 또는 pH 7.3 내지 7.5 등에서 최적의 활성을 나타내는 단백질 가수분해효소를 의미하는 것으로, 세린 단백질 분해효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에서 알칼리 프로테아제는 상업적으로 구입하거나 천연에서 추출 또는 정제해서 사용할 수 있으며, 그 입수 방법에는 제한이 없다. 예를 들어, 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 알칼로필러스(*Bacillus alcalophilus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 등의 바실러스 속 균주와 같이, 알칼리 프로테아제를 생산하는 균주로부터 분리한 것을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 바실러스 리체니포르미스 유래의 알칼리 프로테아제를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본원에서 용어, "알레르기 항원성의 저감화"란 알러젠 단백질의 알레르기 유발 활성을 약화 내지는 소실시켜 알레르기 반응을 약화시키거나 일으키지 않는 것을 말한다.

[0028] 본 발명은 알칼리 프로테아제를 처리한 경우 메밀의 알러젠 단백질을 높은 효율로 가수분해 함으로써 알레르기 항원성을 저감화할 수 있다는 것을 처음으로 규명하였다. 나아가 메밀에 대하여 초고압처리만 하거나, 알칼리 프로테아제만을 처리하는 경우에도 충분한 메밀의 알레르기 항원성 저감화 효과를 얻을 수 있으나, 메밀에 대하여 초고압처리 및 알칼리 프로테아제를 처리함으로써 각각을 처리한 경우에 비하여 우수한 알레르기 항원성 저감화 효과를 얻을 수 있음을 처음으로 규명하였다.

[0029] 본 발명의 알레르기 저감화 기술은, 식품 소재로 사용되는 일반적인 메밀류에 폭넓게 적용될 수 있으며, 예를 들어, 식물 분류학적으로는 주 재배종인 보통메밀(Fagopyrum esculentum)과 달단메밀(Fagopyrum tataricum)을 비롯하여 Fagopyrum rotundatum, Fagopyrum emerginatum, Fagopyrum cymosum, Fagopyrum triangulae 등에 적용될 수 있고, 품종 면에서는 보통종, 달단종, 유시종, 구체적으로는 양절메밀, 대산메밀, 약선메밀, 다원메밀, 평창재래종 등 각종 기능성 품종들에 적용될 수 있다.

[0030] 또한 본 발명에서 메밀은, 통메밀, 메밀 추출물 또는 분획물, 메밀 가루, 메밀 건조물, 메밀 농축물, 메밀 반죽 등 다양한 형태에 적용될 수 있다. 바람직하게, 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 메밀 추출물일 수 있으며, 바람직하게는 용매 추출, 열수 추출, 가압 추출, 환류 추출, 온침 추출, 또는 초음파 추출 등에 의해 제조된 추출물일 수 있고, 이후 감압 여과과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매가 제거된 형태일 수 있다. 또한, 통상적 방법으로 건조된 건조물과 추출 용매가 제거된 농축된 액상의 추출물 또는 고형상의 추출물의 형태일 수 있다.

[0031] 일 구현예로, 본 발명에서 메밀을 100 내지 600MPa 의 압력으로 처리하는 단계는 10 내지 25℃, 바람직하게는 14 내지 16℃에서 1 내지 30분 동안 수행할 수 있으나, 메밀의 양과 품종에 따라 적절히 변경할 수 있다.

[0032] 또 다른 구현예로, 본 발명에서 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시키는 단계는, 알칼리 프로테아제를 일반적으로 200 내지 400U/kg 첨가할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업자가 적절히 선택할 수 있으며, 상기 알칼리

프로테아제는 메밀의 가공 과정 중 어느 단계에나 첨가할 수 있다.

[0033] 바람직하게, 상기 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시키는 단계는 1분 내지 18시간 동안 수행하는 것일 수 있으나, 당업자가 메밀의 양과 품종에 따라 적절히 변경할 수 있다.

[0034] 또한, 상기 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시키는 단계는 pH 6.5 내지 8.5, 및 온도 55 내지 70 ℃의 조건하에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 방법에 따라 제조된 메밀은, 주요 알러젠들이 저분자화되어 알레르기 유발 활성이 약화 내지는 소실된 특징이 있으며, 식품으로 섭취시 알레르기 반응성을 현격하게 감소 내지는 제거시킬 수 있다.

[0036] 본 발명은 하나의 양태로, 본 발명의 방법에 따라 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀에 관한 것이다. 또 다른 양태로, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀을 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

[0037] 본 발명의 방법에 따라 제조된 메밀은 식품 조성물로 이용될 수 있는데, 상기 식품은 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하고, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등일 수 있으며, 추가로, 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 발효 음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0038] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명은 초고압처리 및 알칼리 프로테아제를 처리함으로써 메밀의 알레르기 항원성을 저감시킬 수 있으므로, 본 발명의 제조방법을 이용하는 경우 메밀 내 알러젠 단백질을 아미노산과 같은 저분자까지 효율적으로 분해하면서도 메밀 고유의 건강 기능성 활성 성분이나 물성을 그대로 유지할 수 있고, 이와 같이 개발된 메밀을 건강식품 소재로서 폭넓게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 메밀에 600MPa의 압력을 가하고 토끼 혈청을 이용하여 항원성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 2는 메밀에 알칼리 프로테아제를 처리한 후 토끼 혈청을 이용하여 항원성을 측정한 결과를 나타낸다. "to/n"은 밤새(overnight) 처리한 결과, "Ab"는 항원에 반응한 토끼항체 (antibody), "control"은 50mM carbonate-biscarbonate buffer (pH 9.6, Sigma, USA) 를 나타낸다.

도 3은 메밀에 프로타맥스를 처리한 후 토끼 혈청을 이용하여 항원성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 4는 메밀에 600MPa의 압력을 가하고 알칼리 프로테아제를 처리한 후 토끼 혈청을 이용하여 항원성을 측정한 결과를 나타낸다. "TO"는 알칼리 프로테아제를 처리하지 않은 경우, "T240"은 알칼리 프로테아제를 240분 처리한 결과를 나타낸다.

도 5a는 메밀에 초고압처리 없이 알칼리 프로테아제만 처리한 후 사람 혈청을 이용하여 항원성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 5b는 메밀에 초고압처리 및 알칼리 프로테아제만 처리한 후 사람 혈청을 이용하여 항원성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 6은 메밀에 초고압처리 없이 프로타맥스를 처리한 후 사람 혈청을 이용하여 항원성을 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이

하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실시예 1. 실험 재료 및 실험 방법**

[0043] 1-1. 메밀 조추출물의 제조

[0044] 본 실험에서 사용한 메밀시료는 봉평농업협동조합 강원도 평창군 봉평면에서 생산되는 봉평 메밀가루 100%(국산)를 사용하였다. 메밀가루 5g을 0.033M $NaHCO_3$ 를 함유하는 0.086M NaCl solution 50ml에 4℃에서 밤새 교반하여 추출한 다음 3,000 dalton이하의 분자량을 제거하기 위해 원심분리 필터(Amicon Ultra)를 사용하여 12000g에서 30분 원심분리하였다. 단백질의 농도는 Bio-Rad protein assay Kit를 사용하여 Bradford method로 결정하였다.

[0045] 1-2. 시약 및 기기

[0046] 단백질 분해 효소로는 알칼리 프로테아제(GENENCOR DIVISION에서 구입)을 사용하였다. HCl, NaCl을 비롯한 대부분의 시약은 Ducksan pure Chemical Co., SHOWA Chemical Co.의 제품을 사용하였다.

[0047] 1-3. 항원성 측정 (토끼 혈청)

[0048] 96 well Microplate (BD Biosciences, USA)에 Carbonate-Bicarbonate Buffer(pH 9.6) (Sigma, USA) 용액으로 희석하여 농도를 50ug/ml로 맞춘 sample을 100ul 코팅시켰다(4℃, overnight). 코팅된 plate는 0.05% PBS-Tween 20 (Sigma, USA) 에 3 번 washing한 후, 비특이적 결합을 방지하기 위해 2 % BSA-PBS (Sigma, USA) 200ul로 1시간 blocking시켰다. 토끼 항혈청(한국식품개발연구원, Korea Food Research Institute)을 1:160,000, 비율로 2% BSA-PBS에 희석하여 사용하였다. 혈청 반응은 실온에서 1시간 동안 수행하였으며, plate washing 후, 토끼 항혈청은 2% BSA-PBS로 1:5,000 희석한 goat anti-rabbit IgG-h + l HRP conjugated(1.olng/ml)(Bethyl Laboratories, Inc., USA) 를 첨가하였다. Plate washing 후, TMB peroxidase (3, 3, 5, 5'-tetraethylbenzidine, Sigma, USA) 100uI 첨가 후 30분 반응시켰으며, 같은 양의 1M H_3PO_4 (Duksan, Korea)를 첨가하여 TMB peroxidase의 반응을 종결시켰다. ELISA의 흡광도는 450nm에서 측정하였다.

[0049] 1-4. 알레르기 항원성 측정 (사람 혈청)

[0050] 96 well Microplate (BD Biosciences, USA) 에 Carbonate-Bicarbonate Buffer(pH 9.6) (Sigma, USA) 용액으로 희석하여 농도를 50ug/ml로 맞춘 sample을 100ul 코팅시켰다(4℃, overnight). 코팅 된 plate는 0.05% PBS-Tween 20 (Sigma, USA) 에 3 번 washing한 후, 비특이적 결합을 방지하기 위해 2 % BSA-PBS (Sigma, USA) 200ul로 1시간 blocking시켰다. 환자 혈청 1:320의 비율로 2% BSA-PBS에 희석하여 사용하였다. 혈청 반응은 실온에서 2시 간 동안 수행하였으며, plate washing 후, 환자 혈청 은 2% BSA-PBS로 1:2500 희석 한 goat anti-human IgE-HRP (lug/ml) (Kirkegaard and PeI-ry Laboratories, USA) 를 100ul 첨가하였다. Plate washing 후, TMB peroxidase (3, 3', 5, 5 -tetraethylbenzidine, Sigma, USA) 100uI 첨가 후 30분 반응시켰으며, 같은 양의 1M H_3PO_4 (Duksan, Korea)를 첨가하여 TMB peI'oxidase의 반응을 종결시켰다. ELISA의 흡광도는 450nm에서 측정하였다.

[0051] 사용한 사람 혈청은 혈청 은행으로 지정된 삼성병원 (서울)에 내원한 환자 중 항원 메밀에 대한 항원에 대한 감작도 검사(CAP 검사)에서 양성 반응을 나타내는 환아의 혈청을 사용하였고, 환자에 대한 정보는 아래 표 1에 정리하였다.

표 1

[0052]

Patient No.	Age	Sex	CAP IgE FEIA buckwheat (kUA/L)
1	3	F	10.5
2	4	M	57.6
3	16	F	41

4	3	M	13
8	2	M	51.7
9	4	F	47.2
10	5	M	1.11
11	19	M	9.8
15	2	M	55
16	2	F	24.6
17	3	M	4.18
18	10	M	7.59
19	2	M	1.95
20	1	M	5.54

[0053] **실험결과 1. 메밀 조추출물에 초고압처리를 통한 항원성 감소 확인**

[0054] 초고압처리 장치를 이용하여, 메밀 조추출물에 1분, 10분, 30분 동안 600MPa의 압력을 가하고, 이후 토끼 혈청을 이용하여 메밀의 항원성을 확인하였다.

[0055] 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 압력을 가하는 시간이 증가함에 따라 메밀의 항원성이 감소하는 것을 확인하였고, 600MPa 압력을 30분 동안 가한 경우 45%의 항원성이 감소한 것을 확인하였다.

[0056] **실험결과 2. 메밀 조추출물에 알칼리 프로테아제 처리를 통한 항원성 감소 확인**

[0057] 메밀 조추출물에 알칼리 프로테아제를 0.1, 1, 10%를 각각 0분, 60분, 240분 또는 밤새(overnight) 처리하고, 토끼 혈청을 이용하여 항원성을 측정하였다.

[0058] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 알칼리 프로테아제의 농도가 높아질수록 항원성은 감소하였고, 10% 알칼리 프로테아제를 사용하는 경우가 항원성을 가장 감소시키는 것을 알 수 있었다. 하지만, 비용 및 효율성 측면을 고려할 때, 알칼리 프로테아제 농도를 1%로 240분 처리하는 경우가 가장 효율적으로 항원성을 감소(82% 감소, 대조군 수준)시키는 것을 알 수 있었다.

[0059] **실험결과 3. 메밀 조추출물에 다른 단백질 분해효소 처리를 통한 항원성 감소 확인**

[0060] 메밀 조추출물에 프로타맥스(노보자임에서 구매)를 1, 10, 100%를 각각 0분, 60분, 240분 또는 밤새(overnight) 처리하고, 토끼 혈청을 이용하여 항원성을 측정하였다.

[0061] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 프로타맥스의 경우 최대 100%의 농도로 밤새 처리한 경우에도 메밀의 항원성이 거의 감소하지 않은 것을 확인할 수 있습니다.

[0062] **실험결과 3. 메밀 조추출물에 초고압처리 및 알칼리 프로테아제 처리를 통한 항원성 감소 확인**

[0063] 초고압처리 장치를 이용하여, 메밀 조추출물에 0분, 1분, 10분, 30분 동안 600MPa의 압력을 가한 후, 1%의 알칼리 프로테아제를 240분 동안 처리한 후 메밀의 항원성을 측정하였다.

[0064] 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 초고압처리를 한 시간이 증가할수록 메밀의 항원성이 감소하는 것을 확인하였다. 메밀에 600MPa의 압력을 30분 처리한 경우에 항원이 최대 91%(대조군 수준)까지 감소하는 것을 확인하였다.

[0065] **실험결과 5. 초고압처리 유무에 따른 메밀의 알레르기 항원성 감소 확인**

[0066] 5-1. 초고압처리 없이 알칼리 프로테아제만 처리한 경우

[0067] 메밀에 초고압처리를 하지 않고, 1%의 알칼리 프로테아제를 240분 동안 처리하고, 14명의 메밀 알레르기 환자 혈청을 이용하여 메밀의 알레르기 항원성을 측정하였다.

[0068] 도 5a에서 알 수 있는 바와 같이, 14명의 혈청 중 14명 모두의 알레르기 항원성이 크게 감소(감소율 35~78%)하였고, 14명의 혈청 중 12명의 알레르기 항원성이 보통(normal) 수준으로 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0069] 특히, 메밀에 매우 높은 특이적 반응성을 보였던 15번 혈청의 경우, 아무 처리하지 않은 것과 비교하여 처리 후 알레르기 항원성이 68% 감소한 것을 확인하였다.

[0070] 5-2. 초고압처리 및 알칼리 프로테아제 처리한 경우

[0071] 메밀 조추출물에 30분 동안 600MPa의 압력을 가한 후, 1%의 알칼리 프로테아제를 240분 동안 처리하고, 14명의 메밀 알레르기 환자 혈청을 이용하여 메밀의 알레르기 항원성을 측정하였다.

[0072] 도 5b에서 알 수 있는 바와 같이, 14명의 환자 혈청 중 14명 모두의 알레르기 항원성이 현저하게 감소(감소율 35~86%)하였고, 14명의 혈청 중 13명의 알레르기 항원성이 보통(normal) 수준으로 감소한 것을 확인할 수 있다. 특히, 메밀에 매우 높은 특이적 반응성을 보였던 15번 혈청의 경우, 아무 처리하지 않은 것과 비교하여 처리 후 알레르기 항원성이 77% 감소한 것을 확인하였다.

[0073] 또한, 초고압처리를 하지 않은 경우에 비하여, 초고압처리 및 알칼리 프로테아제 처리한 경우가, 메밀의 알레르기 항원성을 우수하게 감소시킬 수 있음을 입증하였다.

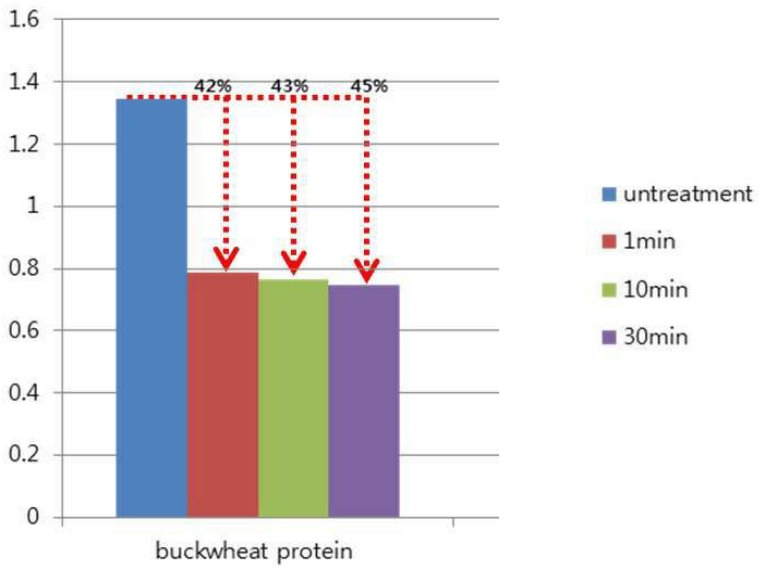
[0074] **실험결과 6. 메밀 조추출물에 다른 단백질 분해효소 처리를 통한 알레르기 항원성 감소 확인**

[0075] 메밀에 100%의 프로타맥스를 밤새 처리하고, 14명의 메밀 알레르기 환자 혈청을 이용하여 메밀의 알레르기 항원성을 측정하였다.

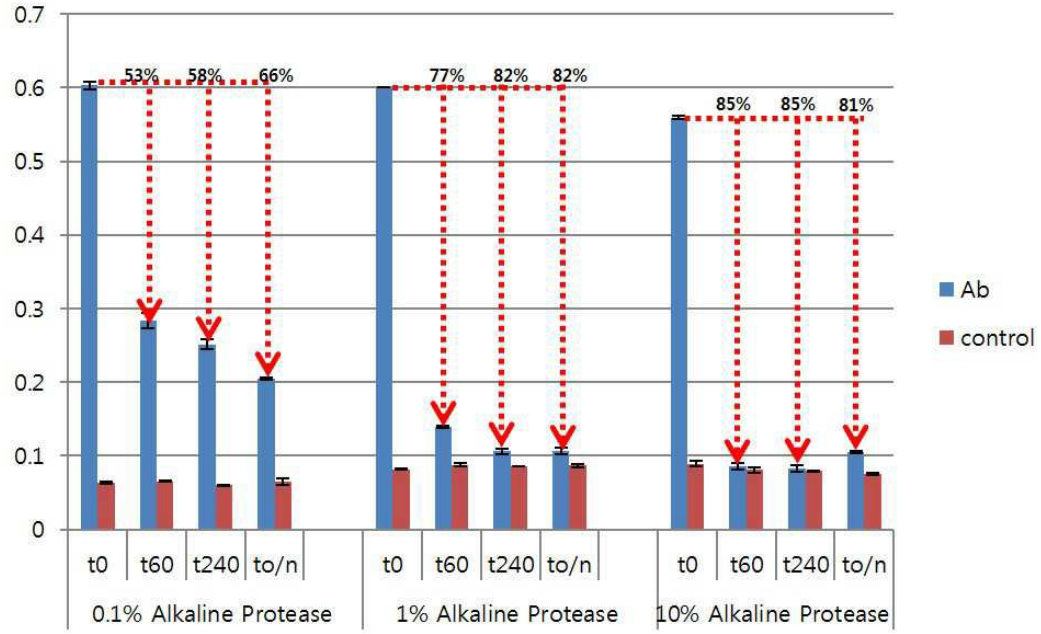
[0076] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 14명의 환자 혈청 중 2명의 경우만 알레르기 항원성이 보통 수준으로 감소하였고, 나머지 환자 혈청의 경우에는 알레르기 항원성이 크게 감소하지 않았으며, 특히, 메밀에 매우 높은 특이적 반응성을 보였던 15번 혈청의 경우, 여전히 메밀에 특이적 반응성을 보이는 것을 확인하였다.

도면

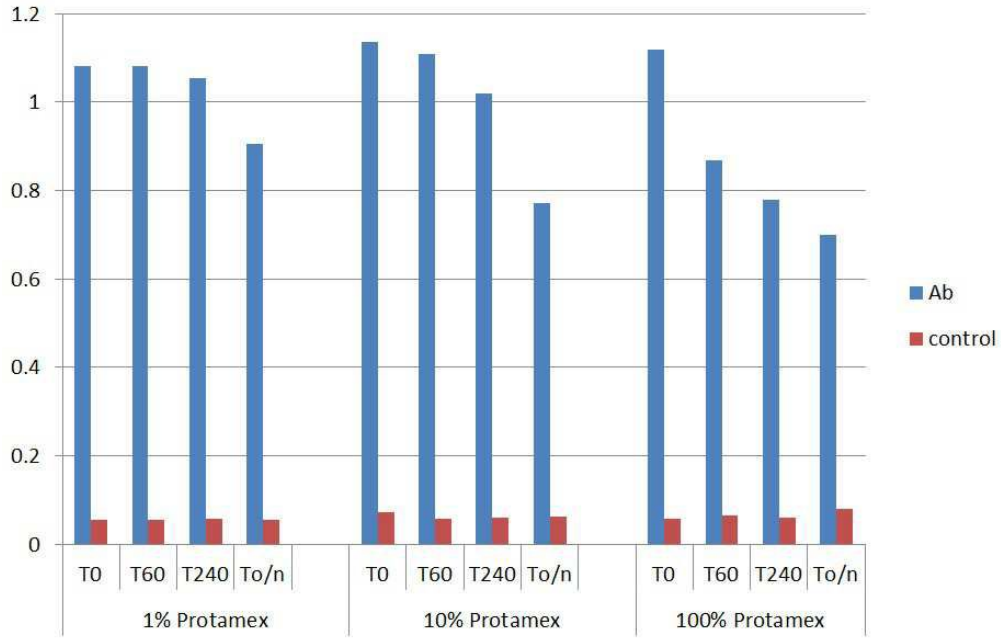
도면1



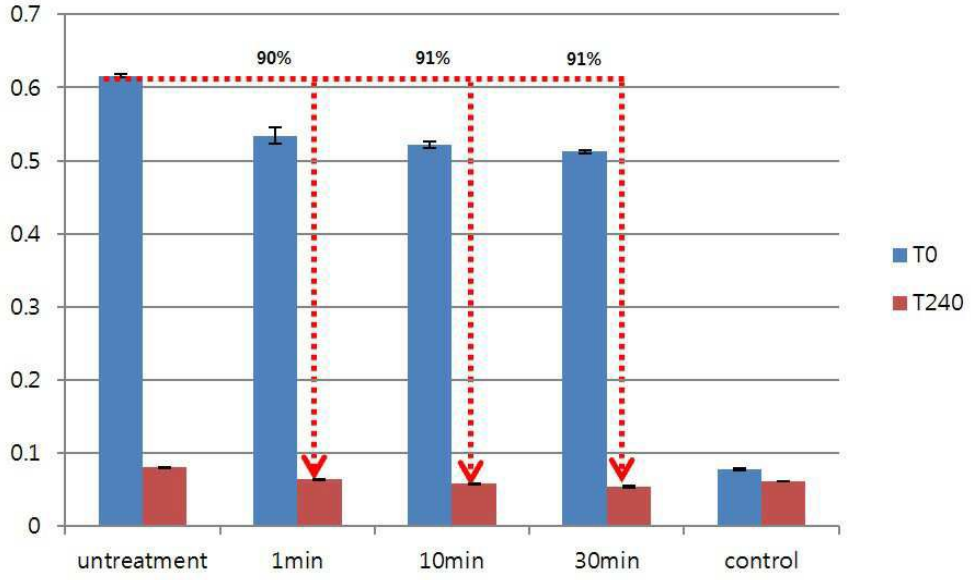
도면2


0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
53%
58%
66%
77%
82%
82%
85%
85%
81%
t0
t60
t240
to/n
0.1% Alkaline Protease
1% Alkaline Protease
10% Alkaline Protease
Ab
control

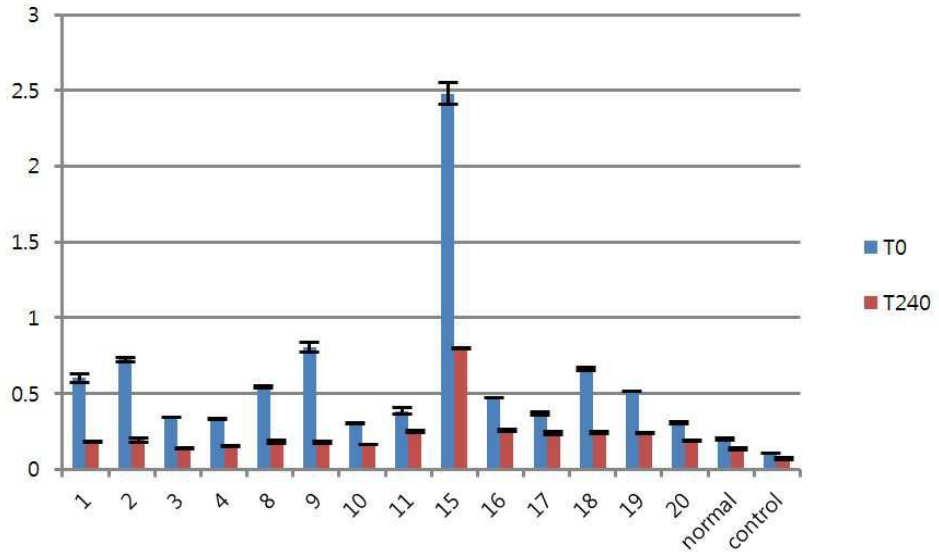
도면3


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
T0
T60
T240
To/n
1% Protamex
10% Protamex
100% Protamex
Ab
control

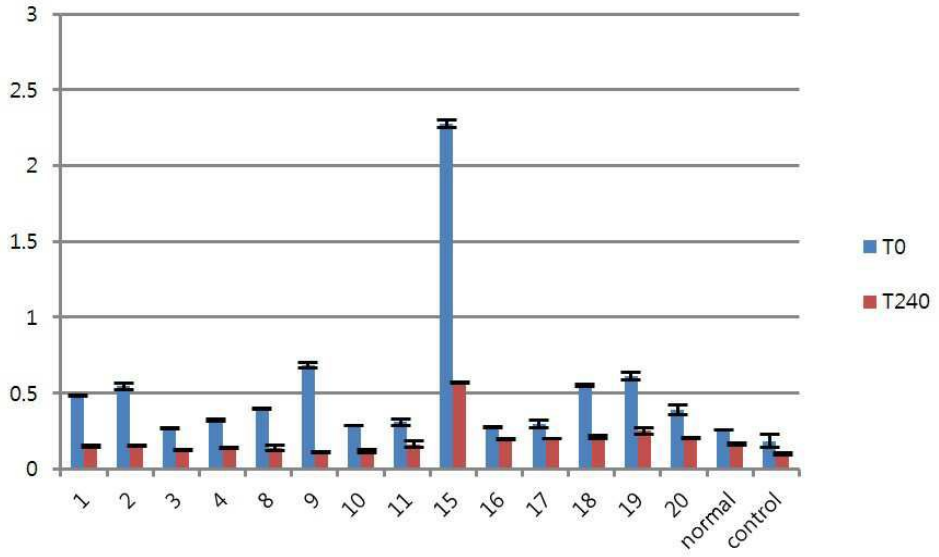
도면4


0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
90%
91%
91%
untreatment
1min
10min
30min
control
T0
T240

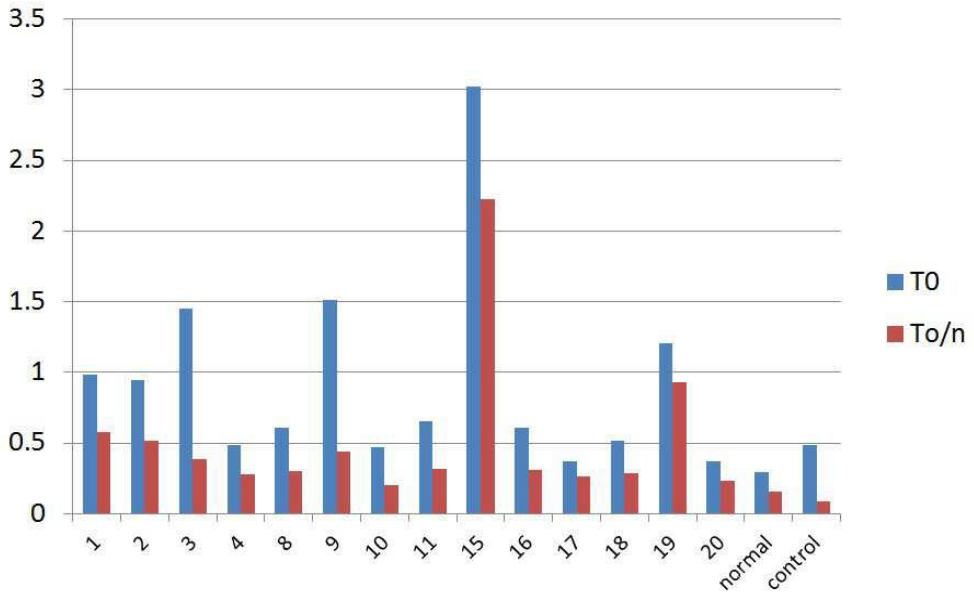
도면5a


3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
2
3
4
8
9
10
11
15
16
17
18
19
20
normal
control
T0
T240

도면5b


3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
2
3
4
8
9
10
11
15
16
17
18
19
20
normal
control
T0
T240

도면6


3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
2
3
4
8
9
10
11
15
16
17
18
19
20
normal
control
T0
To/n