

## 우유단백질의 분석을 위한 효소면역측정법

손동화 · 김현정 · 배근원 · 김순미\*  
한국식품개발연구원, \*가천길대학 식품영양과

### An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Milk proteins in Food

Dong-Hwa Shon, Hyun-Jung Kim, Gun Won Bae and Soon-Mi Kim\*

Korea Food Research Institute

\*Department of Food & Nutrition, Gachon Gil College

#### Abstract

An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was developed for the detection of milk proteins in processed foods. The  $\alpha_{s1}$ -casein( $\alpha_{s1}$ -CN), a heat stable major milk protein, was immunized into rabbits to produce specific antibodies. When competitive indirect ELISA(ciELISA) using anti- $\alpha_{s1}$ -CN antibodies was established, its detection limit was 0.1  $\mu\text{g/mL}$ . The reactivities of the specific antibodies toward  $\alpha_{s1}$ -CN, skim milk,  $\beta$ -CN and whey protein isolate(WPI) were 100, 37, 0.14 and 0.04%, respectively, as determined by ciELISA. However anti- $\alpha_{s1}$ -CN antibodies did not have any reactivity to other milk proteins such as  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, bovine serum albumin, and isolated soy protein. When sandwich ELISA was established, its detection limit was 0.01  $\mu\text{g/mL}$  which was 10 times more sensitive than that of ciELISA. In the spike test which was performed by adding 1-10% of whole CN to market milk, mean assay recovery as determined by sandwich ELISA was 94.8%(CV, 8.2%). Food stuffs and dairy products were assayed by sandwich ELISA to show 29, 0.13, 0.25, and 6.9% of whole CN in skim milk powder, WPI, semi-solid yoghurt, and processed cheese, respectively.

Key words : milk proteins,  $\alpha_{s1}$ -casein, enzyme-linked immunosorbent assay

## 서 론

우유는 맛과 영양을 향상시킬 뿐 아니라 가공적성이 뛰어나 식품 첨가물로서 광범위하게 사용되고 있다. 예를 들어 음료류, 국수류, 과자류, 육 가공품 등에 사용되는데 사용규정이나 표시에 맞게 적량이 사용되었는지, 또는 고가의 재료대신 우유가 대체되어 사용되었는지를 확인하는 것은 소비자의 보호측면에서 꼭 필요하다<sup>(1,2)</sup>. 또한, 우유의 섭취가 극심하게 제한되어야 하는 알레르기 환자의 경우 식품에 우유의 첨가 여부를 확인하는 것은 필수적이다<sup>(3)</sup>.

우유 분석법은 크게 크로마토그래피, 전기영동, 면역분석법 등을 들 수 있는데 이 중 전기영동은 정량

적인 실험에 적용하기가 용이하지 않고 기술의 숙달이 요구될 뿐만 아니라, 감도가 낮은 문제가 있다. 또한, 크로마토그래피는 분석비용이 많이 들고 특이성이 떨어진다는 문제가 있다<sup>(4)</sup>. 면역분석법은 항체의 특이성을 이용하는 방법으로 감도가 높은 분석방법인데 특히, 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay)은 다량의 시료를 단시간에 처리할 수 있는 방법으로 현장에서 적용이 가능하다.

우유단백질중 80%를 차지하는 casein(CN)은 monomer의 분자량이 대략 20-30 kDa이고 4종류 subunit인  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ -CN으로 구성된 단백질과 우유단백질인  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, serum albumin, immunoglobulin 등을 포함하고 있다<sup>(5,6)</sup>. 식품중 우유단백질의 면역학적 분석은 대부분 casein과  $\beta$ -lactoglobulin을 검출 대상으로 한다. 두유중의 우유 첨가 여부를 확인하기 위하여  $\beta$ -lactoglobulin를 검출대상으로 연구한 경우도 있으나<sup>(3)</sup>, 열처리 등의 가공과정을 거친 식품을 분석할 때에는 casein을 지표단백질로 선택할

Corresponding author : Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, San 46-1, Backhyun-Dong, Bundang-Gu, Songnam 463-420, Korea  
Tel : 82-342-780-9133  
Fax : 82-342-709-9876  
E-mail : dhs95@kfri.re.kr

경우가 효과적인데 그 이유는 단백질의 열 안정성 때문이다<sup>7)</sup>.

그러나, 가수분해된 우유의 검출은 항원성의 파괴로 인하여 검출이 곤란한 문제가 있으므로 이를 극복하기 위해서 우유중 casein의 특정 peptide를 검출 대상으로 분석한 경우도 있다<sup>5)</sup>.

본 연구에서는 국내에서 연구가 부진한 우유단백질의 분석법을 개발함으로써 식품과학과 식품산업에 이를 활용하고자  $\alpha_s$ -CN에 대한 특이항체의 생산, 시료의 처리조건 확립, 그리고 CN 분석용 ELISA의 조건을 확립하고 시료분석을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

Trizma<sup>®</sup> 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 conjugate, Freund's complete adjuvant, incomplete adjuvant와 cellulose tubing은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하였다. ImmunoPure Plus IgG Purification Kit(#44679)와 EZ-Link<sup>™</sup> Plus Activated Peroxidase kit는 Pierce사(Rockford, IL, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. 항체 생산을 위한 토끼(New Zealand White rabbit)는 삼육실험동물(오산, 한국)로부터 구입하였다. Nunc사(Roskilde, Denmark)의 Microtiter plate from Maxisorp<sup>™</sup>(#446612)와 THERMOmax<sup>™</sup> Molecular Devices사(Sunnyvale, CA U.S.A.)의 Microplate reader를 사용하였다.

유제품 분석을 위해 시유와 유제품은 '서울우유' 제품을 사용하였고 분리 대두단백은 두산산업사로부터 구입한 supro 500E(Protein Technologists International Co., Checkerboard Square, St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 분리유청단백은 DMV사(Denmark)로 구입하였으며 다른 표준단백질은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다.

### $\alpha_{s1}$ -CN의 정제

Crude  $\alpha_s$ -CN으로부터 3M urea 존재 하에서 Tris-HCl(pH 6.5) buffer로 DEAE Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피를 실시하고 NaCl의 농도구배 0-0.4M로 단백질을 용출시켜  $\alpha_{s1}$ -CN을 분리한 다음 SDS-PAGE로 정제도를 확인하였다. 단백질의 정량은 Lowry법을 보완한 bicinchoninic acid(BCA) 정량법(Pierce,

Rockford, IL, USA)을 이용하였다. 표준물질은 BSA(Sigma)를 사용하였으며, Jasco V-550(SSE-343, Japan)의 분광광도계를 이용하여 569 nm에서 측정하였다. SDS-PAGE는 Laemmli법<sup>8)</sup>에 따라 실시하였으며 gel의 acrylamide 농도는 10%를 사용하였고 100V에서 1시간 동안 실시하였다.

### 항체의 생산

우유단백질에 대한 특이항체의 생산을 위하여 정제된 단백질,  $\alpha_s$ -CN을 PBS(0.25M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.75M NaCl, pH 7.2)에 용해하여 2마리의 토끼에 면역하였다. 이때 일회분의 면역원 양은 500  $\mu$ g으로 하고 PBS에 용해시켜 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 피하주사 하였다. 추가면역은 2-3주 간격으로 같은 방법으로 실시하였고 이때는 incomplete adjuvant를 사용하였으며, 매 면역 일주일 후, 토끼의 귀 정맥으로부터 채혈하고 상온에서 2시간동안 방치하고 혈액을 파스퇴르 피펫으로 저어준 후 냉장보관으로 하룻밤 방치한 다음 원심분리(3,000 rpm, 20 min)하여 항혈청을 분리하였다.

### 항체의 정제

Pierce사의 제품 설명서에 준하여 Ultra Link<sup>™</sup> Immobilized Protein A-column 1 mL을 이용하여  $\alpha_{s1}$ -CN에 대한 다클론 항체를 정제하였다.

항혈청으로부터 항체를 정제하였다. 미리 binding buffer로 평형화시키고 여기에 항혈청을 원심분리(15,000 rpm, 10 min)하여 불용성 침전물을 제거하고 상정액 2 ml과 binding buffer 2 mL을 혼합한 다음 column에 loading한 후 binding buffer로 약 15 mL 정도 Protein A column을 수세한 다음 용출 buffer로 미리 1 M phosphate buffer(pH 7.6) 100  $\mu$ L씩을 넣은 튜브에 1 mL씩 용출, 분획하여 IgG 다클론 항체를 분리하였다. 280 nm에서 흡광도를 측정하고 분리된 항체를 모아 Sephadex G-25(1.6 $\times$ 25 cm) column을 이용하여 PBS로 buffer를 교환하였다.

### 항체-효소 결합체의 준비

정제한 특이항체를 효소(horseradish peroxidase, HRP)와 EDPC법으로 결합시켰다. Sodium carbonate, bicarbonate buffer(0.2M, pH 9.4)로 buffer 교환된 항체 1 mg과 activated horseradish peroxidase 1 mg을 sodium carbonate buffer에 녹인 후 상온에서 1시간 동안 교반시키고 5 M sodium cyanoborohydride 10  $\mu$ L를 첨가하여 상온에서 15분 동안 반응시켰다. 다시

quenching buffer(3 M ethanolamine, pH 9.0)를 20  $\mu$ L를 가하고 상온에서 15분간 반응시켰다. 반응 후의 항체-효소 결합체를 PBS buffer로 4°C에서 투석하여 이를 냉장 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

#### 비경합 ELISA

Microplate에  $\alpha_{s1}$ -CN을 coating buffer(0.02 M Tris buffer, 0.15 M NaCl, pH 9.0)로 2  $\mu$ g/mL이 되게 희석하여 well에 100  $\mu$ L씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 각 well을 washing buffer(10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4, 0.05% Tween 20)로 3회 세척 후 항  $\alpha_{s1}$ -CN 항체는 1/10,000로 washing buffer에 희석한 다음 well에 100  $\mu$ L씩 넣고 1시간 방치하였다. 세척 후 goat anti-rabbit IgG antibody-HRP를 2차 항체로써 1/10,000로 washing buffer에 희석하여 사용하였다.

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  $H_2SO_4$ 로 반응을 정지시키고 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3반복하여 실시하였다.

#### 간접 결합 ELISA (ciELISA)

$\alpha_{s1}$ -CN을 2  $\mu$ g/mL의 농도로 coating buffer(0.02 M Tris buffer 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 9.0)에 용해하고 각 well당 100  $\mu$ L씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하고, 3회 세척 후, 적당 배율로 희석한 항혈청과  $\alpha_{s1}$ -CN의 1:1 혼합액을 100  $\mu$ L씩 넣고, 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 3회 세척하고, 2차 항체처리부터는 비경합 간접 ELISA와 동일한 방식으로 실시하였다.  $\alpha_{s1}$ -CN이외의 우유단백질인 탈지유,  $\beta$ -CN, 분리유청단백, BSA,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin에 대한 특이항체의 반응성으로 교차반응을 확인하였고 이는 ciELISA방법에 준하여 조사하였다. 한편, 시료의 반응성을 검토하기 위하여 먼저  $\alpha_{s1}$ -CN의  $IC_{50}$ 과 다른 시료의  $IC_{50}$ 을 각각 구하였다. 다음으로 전자를 후자로 나누어서 구한 수치(reactivity)로서 상대적인 반응성을 비교하였다.

$$\text{Reactivity}(\%) = \frac{\alpha_{s1} - \text{CN의 } IC_{50}}{\text{시료의 } IC_{50}} \times 100$$

#### Sandwich ELISA

Sandwich ELISA는  $\alpha_{s1}$ -CN과 whole CN에 대한 표준곡선을 구하고자 실시하였다. 즉, microplate에 항 $\alpha_{s1}$ -CN 항체를 2  $\mu$ g/mL의 농도가 되게 coating buffer로

희석하여 100  $\mu$ L씩 분주하여 4°C에서 하룻밤 방치함으로써 항체를 coating하였다. Washing buffer로 세 번 세척한 다음  $\alpha_{s1}$ -CN와 whole CN의 농도를 100  $\mu$ g/mL까지 희석한 다음 100  $\mu$ L씩 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시키고 washing buffer로 세 번 세척 후 항체-효소결합체(anti- $\alpha_{s1}$ -CN항체-HRP)를 적정비율로 희석하여 100  $\mu$ L씩 넣고 상온에서 1시간 방치시킨 후 기질용액을 넣고 30분 동안 반응시켰다. 2 M  $H_2SO_4$ 용액 50  $\mu$ L를 넣고 발색반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Whole CN의 회수를 측정 및 시료의 분석

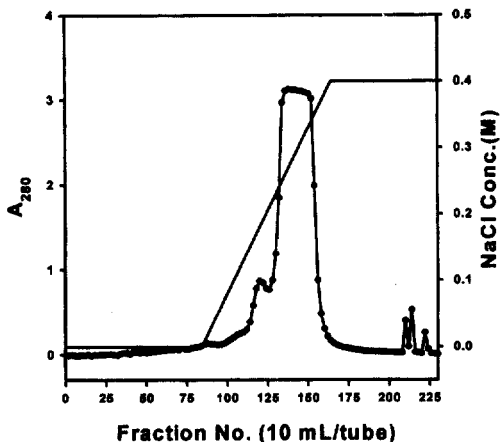
먼저 시유에 일정량의 whole CN을 첨가하여 회수율을 확인하고자 각각 1, 3, 5, 10%의 whole CN을 시유에 첨가한 후 1/1,000,000로 PBS에 희석하여 sandwich ELISA를 실시하였다. 450 nm에서의 흡광도의 평균치를 whole CN을 기준물질로 실시한 sandwich ELISA의 표준곡선으로부터 whole CN농도의 수치를 읽어서 mL당  $\mu$ g농도를 구하였고 이를 %농도로 환산하기 위하여 분석시 시료의 희석배율과 실제 농도를 감안한 보정계수, 100을 곱하여 whole CN의 %농도를 구하였다. 특히, Table 1에 나타난 기대치는 sandwich ELISA를 통하여 whole CN을 첨가하지 않은 시유에 함유된 whole CN의 농도(3.5%)에 1-10%의 whole CN의 함량을 각각 더한 값으로 정하였고 회수율은 기대치에 대한 분석치의 비율로 확인하였다.

분말시료는 잘 분산시킨 다음 하룻밤 냉장온도에서 저장하였고 그 중 탈지 분말은 1/10,000,000로, 분리유청단백과 분리대두단백은 1/10,000로 희석하였고 유제품인 요구르트는 1/100,000로 희석하여 ELISA에 사용하였다. 또한 가공치즈는 식염수를 가하여 슬러리 상태로 만든 후 1/1,600,000로 희석하여 사용하였다. sandwich ELISA의 표준곡선으로부터 whole CN농도의 수치를 읽어서 mL당  $\mu$ g농도를 구하였고 보정계수를 곱하여 실제의 %농도로 보정하였다(Table 2).

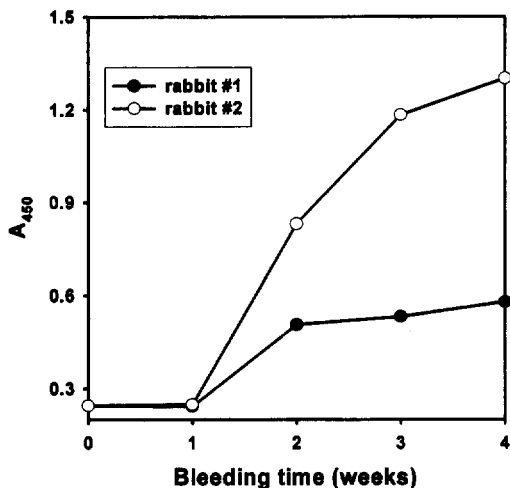
## 결과 및 고찰

#### $\alpha_{s1}$ -CN의 분리 및 특이항체의 생산

$\alpha_{s1}$ -CN을 지표단백질로 하는 우유단백질의 면역분석법을 개발하고자 하였다. 특이성이 높은 항혈청(다른 론 항체)을 얻기 위해서는 높은 순도의 면역원이 필요하므로 우선 crude  $\alpha_{s1}$ -CN으로부터  $\alpha_{s1}$ -CN을 분리, 정제하였다. 즉, DEAE Sephadex A-50 음이온 교환 크로마토그래피를 행한 결과 그 분리 패턴은 Fig. 1 같



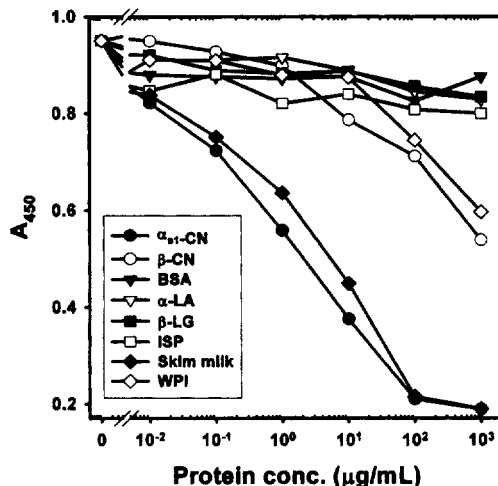
**Fig. 1. Chromatogram of  $\alpha_{s1}$ -CN from crude  $\alpha$ -CN on a DEAE Sephadex A-50 column.**  
A column(2.6x16 cm) was previously equilibrated with 3M urea in 50 mM Tris-HCl buffer(pH 6.5). Crude  $\alpha$ -CN was applied and the absorbed proteins were eluted by linear gradient of NaCl.



**Fig. 2. Production of antibodies by rabbits immunized with  $\alpha_{s1}$ -CN.** Each rabbit was immunized on week 0, 2, 4, and 6, and bled once a week after each immunization.

았다. 성분을 확인하기 위하여 행한 SDS-PAGE의 결과 NaCl 농도 0.3M에서 용출되는 가장 큰 peak이  $\alpha_{s1}$ -CN임을 확인할 수 있었고(data 생략) 이 분획을 회수하여 다음 실험에 사용하였다.

$\alpha_{s1}$ -CN을 면역원으로 하여 실험 방법에 명시한 바와 같이 생산한 항혈청의 항체 역가를 조사하기 위하여 비경합 간접 ELISA를 실시하였다. 2번 토끼에서 3차 면역이후에 높은 항체가를 보여 이후의 실험부터 2번 토끼의 4차 항혈청을 이용하였다(Fig. 2).



**Fig. 3. Cross-reactivities of polyclonal antibodies against  $\alpha_{s1}$ -CN toward milk proteins and soy protein as determined by ciELISA.**

ciELISA was performed as follows; 100  $\mu$ l of  $\alpha_{s1}$ -CN (2  $\mu$ g/mL) in coating buffer was dispensed into the wells of the microplate and 50  $\mu$ l of milk proteins or  $\alpha_{s1}$ -CN as a standard was first added to the wells and 50  $\mu$ l of anti- $\alpha_{s1}$ -CN antibodies were added. And 100  $\mu$ l of goat anti-rabbit IgG HRP conjugate was added and the coloring reaction was carried out. CN: casein; BSA: bovine serum albumin; LA: lactalbumin; LG: lactoglobulin; ISP: isolated soy protein; WPI: whey protein isolate.

간접경합 ELISA(ciELISA)에 의한 항체의 특성조사

$\alpha_{s1}$ -CN의 정량을 위한 ciELISA의 조건을 확립하고 그 표준곡선을 작성한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 항혈청에 대해서 경합반응을 나타내었으며 0.1  $\mu$ g/mL 이상 농도의  $\alpha_{s1}$ -CN이 정량 가능함을 알 수 있었다.

또한,  $\alpha_{s1}$ -CN이외의 우유단백질에 대한 특이항체에 대한 반응성을 조사하였다(Fig.3).  $\alpha_{s1}$ -CN의 특이항체에 대한 반응성을 100%로 볼 때, 탈지유에 대하여는 37%의 높은 반응성을 보였으며 이는 탈지유에 원래  $\alpha_{s1}$ -CN이 함유되어 있기 때문이다.  $\beta$ -CN과 분리유청 단백질(WPI)에 대하여는 각각 0.14%, 0.04%로 나타났고 이러한 결과는  $\beta$ -CN과 WPI에  $\alpha_{s1}$ -CN이 미량 혼입되었기 때문이라고 생각된다. 그러나 그 외의 단백질인 BSA,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, 분리 대두단백(ISP)에 대하여는 거의 반응성을 보이지 않았다. 이로써 본 연구에서 생산된 항혈청에는  $\alpha_{s1}$ -CN에 대한 특이성이 매우 높은 항체가 존재함을 알 수 있었다.

Sandwich ELISA에 의한 우유단백질의 분석

항혈청으로부터 protein A column을 이용하여 정제된 특이항체와 이를 효소(peroxidase)와 결합시킨 항체

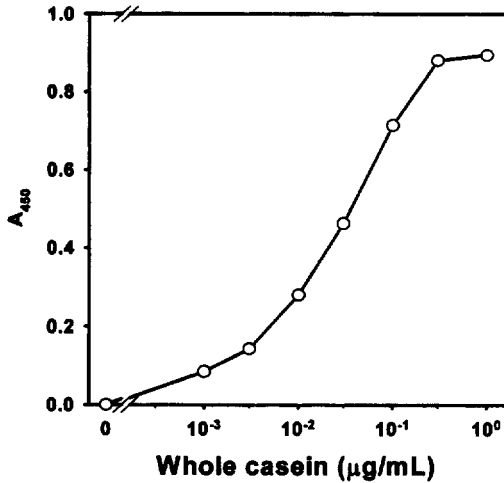


Fig. 4. Typical standard curve for whole CN as determined by sandwich ELISA.

Sandwich ELISA was performed as follows; 100 µL of purified anti- $\alpha_{s1}$ -CN antibodies (2 µg/mL) in coating buffer was dispensed into the wells of the microplate and whole CN was added up to 1 µg/mL as a standard. Then 100 µL of the diluted antibodies-HRP conjugate was added into the wells and the coloring reaction was carried out.

효소 결합체를 이용하여 sandwich ELISA 조건을 확립하였다. 그 표준곡선에서  $\alpha_{s1}$ -CN의 검출한계가 ciELISA의 경우보다 10배 가량 검출 감도가 향상된 0.01 µg/

mL로 나타나  $\alpha_{s1}$ -CN의 분석에는 sandwich ELISA가 더욱 효과적인 것으로 판단되었다(data 생략).

한편, 일반적으로 식품첨가물로서  $\alpha_{s1}$ -CN을 사용하는 경우는 거의 없고 대부분이 whole CN, 탈지유 또는 전지유를 사용하고 때문에 ELISA 분석 시 기준물질로서  $\alpha_{s1}$ -CN 대신 whole CN을 사용한 whole CN의 함량분석이 요구되었다. 탈지유나 전지유가 첨가된 식품의 분석 시 whole CN의 함량을 구하여 그 결과로 이들 첨가물의 함량을 미루어 알 수 있다고 생각하였고 이를 위하여 whole CN을 표준물질로 사용한 sandwich ELISA를 실시한 결과, 표준곡선은  $\alpha_{s1}$ -CN을 표준물질로 사용한 경우와 대체로 유사하게 나타났고 그 검출감도도 0.01 µg/mL로 양호하였다(Fig. 4).

다음으로 whole CN을 시유에 첨가하고 그 함량을 sandwich ELISA로 분석하였다(Table 1). 그 결과 whole CN을 첨가하지 않은 시유 중의 whole CN 함량이 3.5%로서 문헌치(2.9%)<sup>(10)</sup>보다 다소 높게 나타났으나, 1-10%의 첨가농도 범위에서 분석 회수율은 평균 94.8% (CV, 8.2%)로서 양호하였다. 이로서 시료에 1%이상의 CN이 추가로 존재할 경우 정량분석이 가능하다고 생각된다. 한편, Bitri 등<sup>(5)</sup>은 양유에 우유를 0.25%부터 100% 까지 농도별로 첨가하여 경합 ELISA를 실시하여 우유분석의 결과가 양호함을 보고하였다. 본 연구에서 확립한 sandwich ELISA도 혼합유 중 우유성분

Table 1. Recovery of whole casein from spiked milk as determined by sandwich ELISA

Added whole CN	Mean ELISA value <sup>1)</sup>	Assayed whole CN <sup>2)</sup>	Expected whole CN <sup>3)</sup>	Recovery <sup>4)</sup>
-	0.358	3.5%	-	-
1%	0.375	4.3%	4.5%	96
3%	0.438	5.5%	6.5%	85
5%	0.495	8.0%	8.5%	94
10%	0.578	14%	13.5%	104
Average± S.D.				94.8±7.8

<sup>1)</sup>Mean ELISA value of triplicate experiments.

<sup>2)</sup>Assayed whole CN was deduced from sandwich ELISA standard curve by reading mean ELISA value.

<sup>3)</sup>Whole CN % concentration of fresh market milk and the spiked whole CN % concentration make expected whole CN.

<sup>4)</sup>Recovery (%) = assayed whole CN/expected whole CN100

Table 2. Whole casein concentration in dairy products and powder type food stuffs as determined by sandwich ELISA

Exp. Lot	Sample	Mean ELISA value <sup>1)</sup>	Whole casein (µg/mL) <sup>2)</sup>	Corr. factor <sup>3)</sup>	Whole casein (%)
I	semi-solid yogurt	0.597	0.025	10	0.25
	liquid yogurt	0.364	0.007	10	0.07
	processed cheese	0.860	0.043	160	6.9
II	WPI	0.323	0.028	1	0.03
	ISP	0.486	0.078	1	0.08

<sup>1)</sup>Mean ELISA value of triplicate experiments.

<sup>2)</sup>Assayed whole CN was deduced from sandwich ELISA standard curve by reading mean ELISA value.

<sup>3)</sup>Correction factor converts ppm (µg/mL) to % concentration.

분석에 충분히 활용 가능하리라 추측된다.

식품의 소재 중 whole CN의 분석을 위해 sandwich ELISA를 실시하였다. 그 결과 탈지분유의 경우 29%로 나타나 문헌치(27-29%)와 거의 비슷하였으며<sup>(10)</sup> ISP와 WPI에서는 각각 0.08와 0.03%로 나타났는데 이는 항체의 비특이적인 반응에 의한 결과로 생각되었다(Table 2). 따라서, 실제시료 분석시 whole CN의 검출 농도가 0.1%이상일 경우에만 유의한 것으로 판단되었다. 한편, 유제품 시료에 대하여도 whole CN을 분석한 결과, 농후 요구르트와 가공치즈의 분석치는 각각 0.25%와 6.9%로 whole CN함량이 문헌치(약 3.4%, 22%) 보다 낮게 나타났다<sup>(11)</sup>. 이는 발효과정에서 단백질 분해로 인한 결과로 추측된다. 또한 액상요구르트는 0.07%로서 whole CN의 검출한계 이하로 나타났는데 이는 발효시의 가수분해와 발효후의 회석에 의한 것으로 추측된다.

결론적으로 본 연구에서 개발한 whole CN을 지표로 하는 효소면역측정법은 가수분해된 경우를 제외한 식품 중의 우유성분을 분석하는데 실제로 적용 가능하리라 생각된다.

## 요 약

가공식품중의 우유단백질 분석을 위하여 효소면역측정법, ELISA를 개발하였다. 특히 항체를 생산하기 위해 열에 안정하고 우유의 주요한 단백질인  $\alpha_s$ -CN을 토끼에 면역하였다. 항 $\alpha_s$ -CN 항체를 이용하여 간접경합 ELISA를 실시한 결과 검출한계는 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이었고  $\alpha_s$ -CN, skim milk,  $\beta$ -CN과 whey protein isolate에 대한 특이항체의 반응성은 각각 100%, 37%, 0.14%와 0.04% 이었다.

그러나 다른 우유단백질인,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, bovine serum albumin 과 대두단백질인 isolated soy protein에 대해서는 거의 반응성을 보이지 않았다. 샌드위치 ELISA 결과는 검출한계가 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 간접경합 ELISA에 비하여 10배정도 민감해져 따라서 이를 시료 분석에 이용하였다. 시유에 1-10%의 whole CN을 첨가한 spike test 결과 whole CN의 평균 회수율이 94.8%(CV, 8.2%)으로 나타났다. 식품재료와 유가공 제품에 대한 whole CN의 정량분석을 실시한 결과 탈지유는 29%, WPI는 0.03%, 농후 요구르트는 0.25%였으며 가공치즈는 6.9%로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 1995년 농림수산특정 연구사업의 지원으로수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Auguita, G., Martin, R., Garcia, T. Morales, P., Haza, A.I., Gonzales, I., Sanz, B. and Hernandez, P.E. Indirect ELISA for detection of cows' milk in ewes' and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine beta-casein. *J. Dairy Sci.* 62: 655-659 (1995)
- Auguita, G., Martin, R., Garcia, T. Morales, P., Haza, A.I., Gonzales, I., Sanz, B. and Hernandez, P.E. Immunostick ELISA for detection of cow's milk in ewe's milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein. *J. Food Prot.* 59: 436-437 (1996)
- Elena, M., Lourdes, A. and Mercedes, R. Detection of bovine milk proteins in soymilk by western blotting. *J. Food Prot.* 61(12): 1691-1694 (1998)
- Garcia, M.C., Marina, M.L. and Torre, M. Simultaneous separation of soy bean and animal whey proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 69: 2217-2220 (1997)
- Bitri, L., Rolland, M.P. and Besancon, P. Immunological detection of bovine caseinomacropeptide in ovine and caprine dairy products. *Milchwissenschaft* 48: 367-371 (1993)
- Nakamura, T., Syukunobe, Y., Sakurai, T. and Idota, T. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwissenschaft* 48: 11-14 (1993)
- Marie-paule, R., Lotfi, B. and Pierre, B. Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine  $\alpha_s$ -casein : application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *J. Dairy Res.* 60: 413-420 (1993)
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- Auguita, G., Martin, R., Garcia, T. Morales, P., Haza, A.I., Gonzales, I., Sanz, B. and Hernandez, P.E. Immunological characterization of bovine casein fractionated by fast protein liquid chromatography (FPLC). *Milchwissenschaft* 51: 21-25 (1996)
- Byron, H.W., Arnold, H.J. and John, A.A. Composition of milk products. pp. 61. In *Fundamentals of dairy chemistry*. AIV publishing company. INC. Westport. Connecticut (1974)
- Byron, H.W., Arnold, H.J. and John, A.A. Composition of milk products. pp. 77. In *Fundamentals of Dairy Chemistry*. AIV publishing company. INC. Westport. Connecticut (1974)