



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

工學碩士 學位論文

물리적 처리에 의한 초임계
이산화탄소 처리 밀가루 및 밀반죽의
항원성 변화



2011年 8月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

郭 智 姬

工學碩士 學位論文

물리적 처리에 의한 초임계
이산화탄소 처리 밀가루 및 밀반죽의
항원성 변화

指導教授 安 東 賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함



2011年 8月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

郭 智 姬

郭智姬의 工學碩士 學位論文으로 認准함

2011年 8月



주	심	수산학박사	조 영 제	㉠
위	원	공학박사	전 병 수	㉠
위	원	농학박사	안 동 현	㉠

목 차

Abstract

서 론	1
재료 및 방법	5
1. 실험재료	5
1-1. 원료	5
1-2. 표준항원 및 항체	5
2. 방법	5
2-1. Competitive indirect enzyme linked immunosorbent assay(Ci-ELISA)의 실험조건	5
2-2. Ci-ELISA의 titration curve	6
2-3. Ci-ELISA의 standard curve	6
2-4. 물리적 처리	7
2-4-1. 초임계 이산화탄소 처리	7
2-4-2. 감마선 처리	7
2-4-3. 초고압 처리	7
2-4-4. 가압가열 처리	8
2-4-5. Microwave 처리	8
2-5. 밀가루의 반죽	8
2-6. Gliadin 추출 및 농도 측정	8

2-7. SDS-PAGE 및 Native-PAGE·····	9
2-8. Immunoblotting·····	10
2-9. 통계처리 ·····	10
결과 및 고찰 ·····	12
1. Ci-ELISA ·····	12
1-1. Titration curve ·····	12
1-2. Standard curve ·····	12
2. 물리적 처리에 의한 밀가루 및 밀반죽의 항원성 변화 ·····	15
2-1. 초임계 이산화탄소 처리에 의한 변화 ·····	15
2-2. 초임계 이산화탄소와 감마선 병행 처리에 의한 변화 ·····	18
2-3. 초임계 이산화탄소와 초고압 병행 처리에 의한 변화 ·····	24
2-4. 초임계 이산화탄소와 가압가열 병행 처리에 의한 변화 ·····	30
2-5. 초임계 이산화탄소와 microwave 병행 처리에 의한 변화 ···	37
2-6. 초임계 이산화탄소, 가압가열 및 microwave 병행 처리에 의 한 변화 ·····	43
요 약 ·····	52
참 고 문 헌 ·····	55

Changes in Allergenicity of Gliadin in Wheat Flour and Dough by Physical Treatments

Ji-Hee Kwak

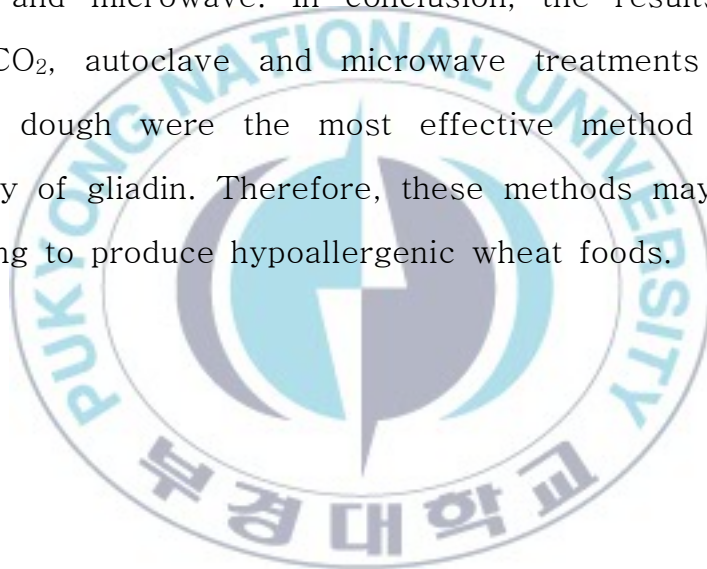
Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Food allergies involve severely hypersensitive reactions to the consumption of certain allergic foods. Some foods such as milk, eggs, fish, peanuts, wheat and seafood commonly induce the allergic reactions after ingestion. Recently, wheat flour has been reported as a causative agent of allergic reactions. Gliadin, component of gluten, is known as a important allergen which cause allergic reactions to patients who have wheat allergy. Currently, the best way to reduce the allergenicity is the elimination diet for the avoidance, but it causes the nutritional problems. So far, various food processing techniques have been used to reduce the allergenicity of allergic food. However, the allergenicity of wheat after physical processing is not well-known. For this purpose, this study was conducted to

investigate the effect of physical treatments on the antigenicity of gliadin in wheat flour and dough. The wheat flour was treated with supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) and knead dough. Then the flour and dough were treated with gamma irradiation (1, 5, 10, 20 kGy), high hydrostatic pressure (HHP) (100, 300, 500 MPa, 3 min), autoclave (5, 10, 30, 50 min at 121 °C, 1 atm) and microwave (1, 5, 10 min) and autoclave/microwave (10, 30, 50 min/5, 10 min). After treatments, the conformational changes were observed by SDS-PAGE and the binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin was examined by Ci-ELISA and immunoblotting. Furthermore, the binding ability of wheat-allergic patient's serum to gliadin was measured by Ci-ELISA. The results showed that gamma irradiation and HHP treatments were not able to decrease the binding ability of gliadin in wheat flour and dough. Also, the microwave treatment didn't effect the antigenicity of gliadin in wheat flour and dough although conformational changes were observed at 14, 27 and 30 kDa in wheat dough. On the other hand, an important reduction in antigenicity after autoclaving at 121°C over 30 min was observed. When wheat flour was treated with autoclave after SC-CO₂ treatment, it showed slight decrease in the binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin, and there was also a little decrease as it treated with SC-CO₂,

autoclave and microwave. In case of SC-CO₂ treated wheat dough, it revealed more decreased binding ability as it was treated with autoclave and microwave than autoclaved. Especially, it showed the lowest binding ability of wheat flour (50 min autoclaved and 5 min microwave heated, about 84%) and dough (the binding ability of gliadin in all samples was decreased more to below 40%) as treated with SC-CO₂, autoclave and microwave. In conclusion, the results indicated that SC-CO₂, autoclave and microwave treatments on wheat flour and dough were the most effective method to reduce antigenicity of gliadin. Therefore, these methods may be useful for applying to produce hypoallergenic wheat foods.



서 론

알레르기(allergy)는 특정 항원에 의해 항체가 생산된 결과 항원에 대한 이상한 병적 반응을 나타내는 현상을 말하며, 최근 경제성장으로 인한 환경과 식습관의 변화, 스트레스 증가 등으로 인해 지속적으로 그 발생이 증가하고 있다. 그 중 식품알레르기는 항원이 되는 특정 식품을 섭취 후에 발생하는 비정상적인 반응을 통칭하는 것이며, IgE 항체가 관여하는 전형적인 알레르기 반응과 IgE 항체외의 면역학적 기전에 매개되는 과민반응으로 구분하고 있다(Sampson, 1999; Lee, 2006).

식품알레르기는 영·유아에서 주된 알레르기 증상을 나타내는 것으로, 유아에서는 약 8-10%, 성인에서는 약 2% 정도로 나이가 어릴수록 발생빈도가 높으며 연령의 증가와 함께 감소하는 경향이 있다(Bock et al., 1987). 식품이 장관을 통과하면 소화효소에 의해 저분자로 분해되어 알레르기를 발생시키지 않는다고 본다(Hefle, 1996). 그러나 유아는 장이 완전히 완성되어 있지 않기 때문에 분해되지 않은 상태로 장관을 통과해서 유아기에 알레르기가 많이 일어난다(Shon, 2000). 이는 성인이 될수록 장관이 성숙하게 되면서 자연적으로 없어지거나 체질적으로 특이한 사람에게서는 계속 일어난다(Han et al., 2004).

식품 알레르기의 증상으로는 두드러기, 천식, 구토, 설사, 혈관부종, 아토피피부염 등이 있는데, 이외에도 심한 경우는 전신증상으로 아나필락시스의 증상이 나타나기도 한다. 이러한 식품 알레르기의 원인 물질이 되는 항원은 일반적으로 10-70 kDa의 당단백질로 다른 식품 단

백질에 비해 비교적 열에 안정하고 소화효소의 영향을 덜 받는다(Lee, 2006). 따라서 일부 식품들에 한정되어 있으며, 국가마다 식생활의 차이로 인해 다르기는 하지만 주로 알레르기를 일으키는 식품으로는 우유, 계란, 밀, 갑각류, 생선, 콩 및 견과류 등이 있다고 알려져 있다 (Food and Agriculture Organization, 1995). 우리나라의 알레르기 유발식품에 대한 표시제도에 따르면 계란류, 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아 및 토마토의 12개 식품이 한국인에 주로 알레르기를 유발하는 것으로 밝혀졌다(Korean Food and Drug Administration, 2011). 또한 손 등(2002)의 연구에서는 환자마다 차이가 있지만 주로 계란, 우유, 대두, 메밀 및 밀이 주요 5대 알레르기 원인 식품인 것으로 밝혀졌다.

한편, 국민 소득 및 생활수준의 향상으로 우리나라에서도 서구식 식생활이 보급되어 밀은 쌀에 이어 제 2의 주식으로 자리 잡게 되었으며, 밀 가공 제품이 차지하는 비율이 점점 높아지고 있다. 이렇게 밀의 섭취율의 증가와 함께 밀 알레르기 발생 빈도 또한 증가하고 있는 추세이다. 밀의 주요 알레르기 항원으로는 유럽 지역에서 밀가루를 취급하는 사람들에게서 주로 발견되는 질병인 'Baker's asthma'라고 하는 천식의 원인 물질인 α -amylase inhibitor(20-25 kDa)가 동정되어 있다. 또한 gliadin과 glutenin으로 구성되어 있는 gluten이 밀 알레르기를 일으키는 주요 단백질로 알려져 있다(Shon, 2000). Gluten은 글루텐 과민성 장질환을 일으키는데 gluten 단백질 내에 있는 gliadin이 소장 점막을 손상시켜 영양소 흡수에 장애가 되는 만성질환을 일으킨다. 알코올에 녹는 gliadin은 α -, β -, γ - 및 ω -gliadin으로 나뉘어지며, 각

각의 두드러기, 아나필락시스 등 다양한 증상을 가진 환자의 IgE와 반응하는 주요 epitope가 밝혀져 있다(Battais et al., 2005).

현재까지 식품알레르기의 치료 방법으로는 원인이 되는 식품을 직접 제거식이 방법, 항히스타민제, 스테로이드제 등의 약물 치료 및 면역치료법 등이 알려져 있다(Lee, 2004). 그러나 이러한 치료법은 지속적인 치료가 불가능하며, 또한 우유, 계란, 대두, 밀 등의 알레르기를 일으키는 식품들은 대부분 단백질 공급원이기 때문에 이를 기피할시 영양학적으로 문제가 된다. 식품 알레르기 환자들은 알레르기 원인이 되는 식품을 소량 섭취하더라도 알레르기 증상이 나타나는 경우가 빈번하다. 특히 밀은 현재 우리나라에서 주식으로 자리 잡고 있으며, 빵, 면, 과자 등 다양한 가공품으로 이용되기 때문에 섭취의 회피에 한계가 있다. 알레르기를 저감화시키기 위해서는 원인 물질인 단백질의 제거가 효과적인데, 단백질 분자 중에서도 항체와 결합하는 등 실제로 알레르기 반응에 관여하는 부분인 epitope(에피토프)라고 불리는 부분을 파괴 또는 제거함으로써 단백질 항원을 저감화시킬 수가 있다(Kim et al., 2003). 이에 최근 감마선 조사, 가압가열, microwave 및 초고압 처리와 같은 물리적 방법과 효소처리와 같은 화학적 방법 등을 이용하여 단백질, 특히 epitope 부분을 변성시킴으로써 식품알레르기를 억제시키는 연구가 시도되고 있다. 그러나 밀의 알레르기 저감화에 관한 연구로는 국외의 경우 주로 효소적 처리 방법을 이용하였으며(Kumagai et al., 2007; Maruyama et al., 1999), 특히 물리적 처리로는 gliadin에 대해 감마선과 microwave 처리를 하여 항원성을 감소시키기 위한 시도를 하였지만 큰 효과를 얻지 못한 것으로 보고되었다

(Leszczynska et al., 2003a; Leszczynska et al., 2003b). 이에 반해 국내에서는 효소분해에 의한 밀가루의 항원성 변화(Park et al., 2004)에 대한 보고가 되어 있을 뿐 물리적 처리를 이용한 연구는 미비한 실정이다.

식품 가공 중에 이용되는 고온 또는 고압 처리는 단백질의 변성을 가져옴으로서 식품의 항원성을 변화시킨다고 알려져 있어(Davis et al., 1998; Gross et al., 1994), 알레르기를 저감화시키기 위해 열, autoclave, microwave, 고압 및 초고압 처리 기술 등이 주로 사용되고 있다. 또한 초임계 유체 기술은 무독성, 친환경, 저에너지 용매를 사용하는 기술로서 최근 식품산업에서의 그 중요성이 확대되고 있다. 특히 추출분리, 분획 및 살균 등의 식품가공기술에 사용되고 있으며, 초임계 이산화탄소 처리에 의해 단백질의 구조적 변화에도 영향을 미친다고 알려져 있어(Winters et al., 1995; Xu et al., 2011), 그 응용 범위가 넓어지고 있다.

식품 항원이 식품가공에 중요한 역할을 하는 단백질인 경우, 그것의 제거나 분해에 의해 제조된 저알레르기 식품의 가공 특성은 원재료에 비해 저해된다는 점을 고려해야 한다. 밀 알레르기를 일으키는 주요 항원은 밀 가공 제품 개발시 가공 특성과 밀접한 연관이 있는 단백질이므로 가공 특성에 큰 영향을 미치지 않는 알레르기 저감화를 위한 방법이 필요하다. 이에 본 연구에서는 초임계 이산화탄소 등 물리적 처리에 의한 밀가루와 밀가루 반죽에서 gliadin의 항원성 변화에 대해 알아보기 위해 gliadin 단백질 및 항원성 변화를 측정하여 저알레르기 밀가공 제품 개발을 위한 최적 조건을 탐색하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 원료

본 실험에 사용한 밀가루는 (주) 영남제분에서 제공받은 것으로 1등 강력밀가루를 사용하였다.

1-2. 표준항원 및 항체

표준 항원으로 사용된 gliadin, 1차항체로 사용된 anti-gliadin IgG 및 2차항체로 사용된 anti-rabbit IgG peroxidase antibody conjugate는 Sigma사(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

2-1. Ci-ELISA의 실험 조건

Gliadin의 항원성 변화를 알아보기 위해 Lee 등(1998)의 방법을 변형하여 Ci-ELISA를 실시하였다. 0.2 M bicarbonate coating buffer (pH 9.6)를 이용하여 gliadin을 일정 농도로 희석한 뒤, costar 96-well flat bottom plate(469957; Nunc, Kamstrupvej, Denmark)의 well에 100 μ L씩 분주하였다. 4℃에서 하룻밤 동안 coating 시킨 후, 비특이적인 반응을 막기 위해 1% gelatin 용액으로 blocking하였

다. 0.01 M PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.3)를 이용하여 일정한 농도로 희석 항원과 항체를 각각 50 μ L씩 분주하여 반응시켰다. 각각 1:30,000의 비율로 희석된 2차 항체를 넣은 다음 OPD(o-phenylenediamine, Sigma Chemical Co.) 용액으로 발색시켰다. 그 후 2 M H_2SO_4 로 반응을 중지시켜 ELISA reader(Model 550, Bio-rad, CA, USA)의 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 단계별 반응조건은 37℃에서 2시간이며 각 단계가 끝날 때마다 0.01 M PBST[phosphate buffered saline containing 0.1% tween 20(v/v)] 용액으로 4회씩 수세하였다.

2-2. Ci-ELISA의 titration curve

Titration curve는 표준 항원과 1차 항체와의 최적 결합 적정 농도를 알아보기 위하여 실시한 것으로 Lee 등(1998)의 방법을 약간 변형하여 행하였다. Coating buffer(pH 9.6)를 이용하여 100, 200 및 400 μ g/mL로 희석한 표준 항원을 well에 분주한 뒤, 4℃에서 하룻밤 overnight 시켰다. 그 다음 0.01 M PBS(pH 7.3)를 이용하여 각 농도별로 희석한 1차 항체를 100 μ L씩 반응시켰다. 이하 모든 과정은 2-1의 실험조건과 동일하게 진행되었다.

2-3. Ci-ELISA의 standard curve

2-1과 같은 방법으로 표준항원을 coating시킨 well에 0.01 M PBS (pH 7.3)를 이용하여 항원을 200에서 0.195 μ g/mL까지 희석한 다음 각각의 희석액을 well에 50 μ L씩 분주한 후 titration curve에서 결정

된 항체의 희석농도로 50 μ L씩 분주하였다. 이하 모든 과정은 Ci-ELISA의 실험조건과 동일하며 표준 항원과 항체의 100% 결합을 위해 항체 50 μ L와 0.01 M PBS 50 μ L만을 well에 첨가하였으며 blank로서 0.01 M PBS 100 μ L를 첨가하였다.

2-4. 물리적 처리

2-4-1. 초임계 이산화탄소 처리

실험에 사용된 초임계 추출 장치는 batch식 extractor를 사용하였다. 시료인 밀가루를 반응기에 넣은 다음, 기체상태의 이산화탄소를 냉각조를 통과시켜 액화시키고 고압 pump를 이용하여 일정한 온도로 원하는 압력과 시간동안 초임계 상태의 이산화탄소를 반응시켜 주었다.

2-4-2. 감마선 처리

밀가루 및 밀반죽은 한국 원자력 연구소의 Co-60 감마선 조사시설 (선원: 11.1 PBq, ^{60}Co)을 이용하여 실온에서 시간당 일정 선량으로 1, 5, 10 및 20 kGy의 흡수선량을 얻도록 조사하였다. 조사한 시료는 4℃ 냉장 보관하며 사용하였다.

2-4-3. 초고압 처리

밀가루 및 밀반죽을 진공 포장한 다음 초고압기(215L-600 ULTRA, AVURE Technologies Inc., WA, USA)의 processing chamber에 넣어 수온 약 8-10℃에서 100, 300, 500 MPa의 정수압으로 각각 3분

간 초고압 처리하였다.

2-4-4. 가압가열 처리

밀가루는 일정량을 시험관에, 밀가루 반죽은 수분 손실을 막기 위해 진공포장한 뒤, 가압멸균기(DW-AC 920, D.W. Industries, Korea)에 넣고 온도 121℃, 게이지압 1 kg/cm²에서 5, 10, 30 및 50분 동안 가압가열 처리하였다. 처리 후 냉각시킨 뒤 gliadin을 추출하여 실험에 사용하였다.

2-4-5. Microwave 처리

증류수로 채운 beaker에 밀가루가 들어있는 시험관 및 진공포장된 밀반죽을 넣은 후 중탕하며 1, 5 및 10분간 microwave (MW-272LB, LG, Seoul, Korea) 처리하였다. 이 때 사용한 주파수는 2,450 MHz이고 정격고주파출력은 700 W이었다.

2-5. 밀가루 반죽

밀가루를 100% 기준으로 48%의 염수를 첨가하였으며, 최종 염농도는 1%이었다. 그 뒤 10분간 반죽하였고, 반죽은 약 2 mm 정도의 일정한 두께로 얇게 편 뒤 진공 포장하여 실험에 사용하였다.

2-6. Gliadin 추출 및 농도측정

Leszczynska 등(2003)의 방법에 따라 표준항원으로 사용된 gliadin 및 물리적 처리한 밀가루와 세절한 밀반죽에 40% 에탄올을 1:1 비율

로 가하여 10분간 shaking하여 gliadin을 추출하였다. 그 후 원심분리기(Micro 17TR, Hanil Co., Incheon, Korea)를 이용하여 2,500 × g에서 10분간 원심분리하고 얻어진 상층액을 실험에 사용하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, IL, USA)로 측정한 뒤, 일정 농도로 희석하여 Ci-ELISA, SDS-PAGE 및 immunoblotting에 사용하였다.

2-7. SDS-PAGE 및 Native-PAGE

밀가루와 밀반죽 gliadin의 변화를 알아보기 위해 Laemmli(1970)의 방법을 사용하여 17% separating gel과 4.5% stacking gel로 구성된 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)를 실시하였다. 1 mg/mL 농도로 희석한 시료와 sample buffer(16 mM tris-HCl; pH 8.0, 6.2 mM EDTA, 31% glycerol, 3.1% SDS) 및 2-mercaptoethanol을 혼합한 후 2분동안 가열하였다. 그 후 BPB 용액(0.1% bromophenol blue, 50% glycerol)을 가한 후 냉동보관하며 실험에 사용하였다. Loading한 후의 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 marker로는 protein marker(New England BioLabs, MA, USA)를 사용하였으며, 분자량별 standard는 B chain(2.3 kDa), insulin A(3.4 kDa), aprotinin(6.5 kDa), lysozyme(14.3 kDa), trypsin inhibitor(20 kDa), triosephosphate isomerase(27 kDa), thioredoxin reductase(34.6 kDa), MBP2(42.7

kDa), glutamic dehydrogenase(55.6 kDa), serum albumin(66.4 kDa), phosphorylase b(97 kDa), β -galactosidase(116 kDa), MBP- β -galactosidase(158 kDa), myosin(212 kDa)을 이용하였다. 또한 Native-PAGE는 10% running gel을 사용하였으며, SDS와 β -mercaptoethanol 첨가 및 가열 처리 과정을 제외하고 SDS-PAGE와 동일하게 진행되었다.

2-8. Immunoblotting

Towbin 등(1979)의 방법을 참고하여 SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 methanol-activated polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane(Bio-rad, CA, USA)에 150 mA에서 5시간 동안 전사시킨 후 각 strip을 3% gelatin으로 1시간동안 blocking 시켰다. 1차 항체로 anti-gliadin IgG를 1% gelatin을 사용하여 128 μ g/mL 농도로 희석하여 3시간 30분간 반응시킨 후 TBST(tris buffered saline; pH 7.5) 용액으로 3회 세척하였다. 2차 항체로 anti-rabbit IgG를 TBST로 1:1,000의 비율로 희석시켜 1시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세척한 뒤, DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma Chemical Co.) 용액을 기질로 사용하여 발색시킨 다음 반응정도를 관찰하였다. 모든 과정의 실험은 실온에서 진행되었다.

2-9. 통계처리

실험 결과의 통계처리는 SAS program(Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 평균

값을 분산분석한 후, Duncan의 다중검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 항목들 간의 유의적 차이를 검정하였다.



결과 및 고찰

1. Ci-ELISA

1-1. Titration curve

표준 항원과 결합하는 항체인 anti-gliadin IgG와의 최적 결합 희석 농도를 찾기 위하여 항원과 항체를 각각 여러 농도로 희석하여 titration curve를 그렸다. 그 결과(Fig. 1), 항원의 경우 200 µg/mL로 항체의 경우 64 µg/mL로 희석하였을 때 각각의 희석 항체 및 항원과 가장 강하게 반응하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 coating 항원의 희석 농도는 200 µg/mL이었으며, 항체는 64 µg/mL이었다.

1-2. Standard curve

200 µg/mL 농도의 항원과 64 µg/mL 희석농도의 anti-gliadin IgG로 standard curve를 그렸을 때, anti-gliadin IgG와 반응하는 gliadin의 농도는 다음의 식으로 구할 수 있었다.

$$X = e^{\left(\frac{0.9756 - y}{0.243}\right)}$$

x = anti-gliadin IgG와 반응하는 gliadin의 농도

y = absorbance value

이 때 anti-gliadin IgG와 반응하는 gliadin의 최적 검출 농도 범위는 0.98에서 31.25 µg/mL이었고(Fig. 2), 오차 범위는 $p \leq 1$ 이었다.

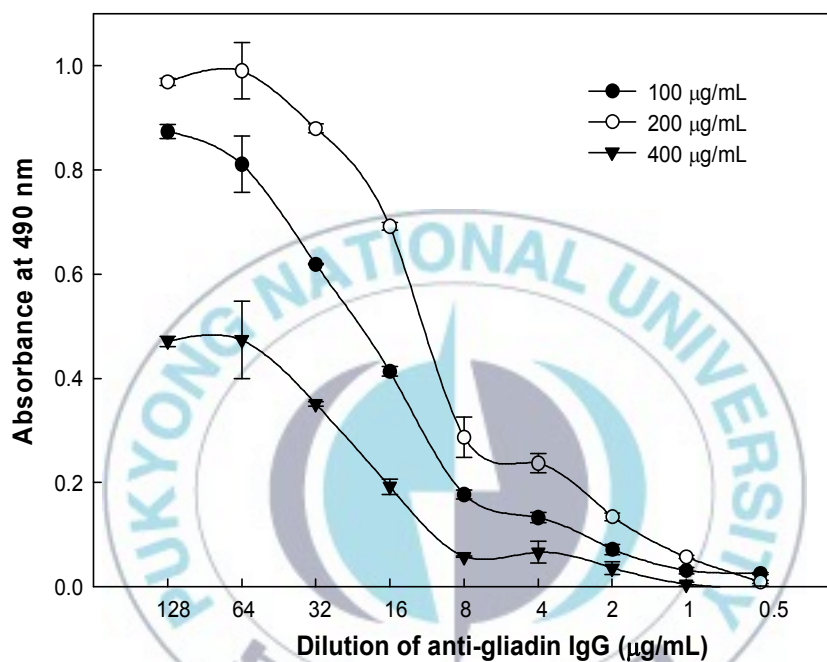


Fig. 1. Titration curves of anti-gliadin IgG against different coated gliadin to format analytical condition of Ci-ELISA. Secondary IgG solution was diluted to 1:30,000 with 0.01 M PBS.

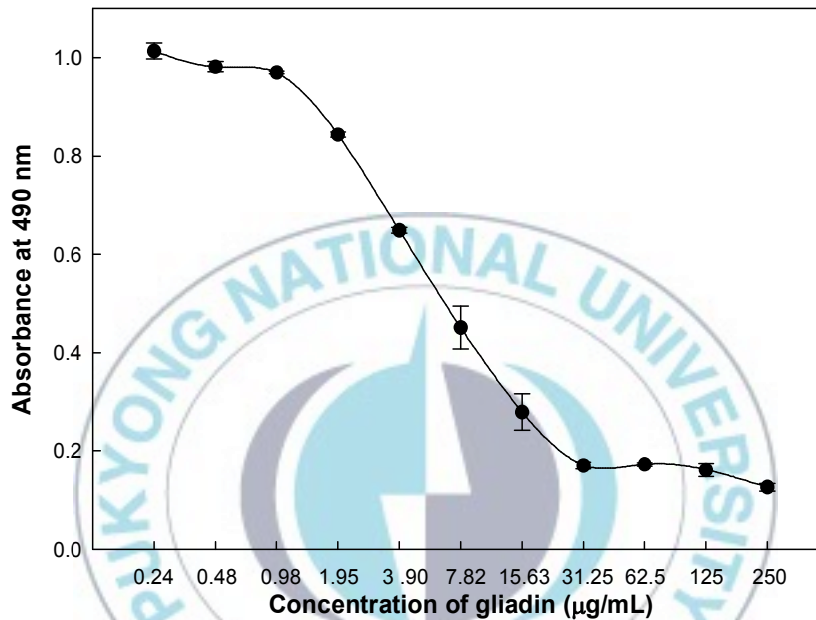


Fig. 2. Standard curve of anti-gliadin IgG to gliadin by Ci-ELISA. Gliadin was used as a coating antigen. Anti-gliadin IgG was used for capturing gliadin. Gliadin was serially diluted from 250 to 0.24 µg/mL.

2. 물리적 처리에 의한 밀가루 및 밀반죽의 항원성 변화

2-1. 초임계 이산화탄소 처리에 의한 변화

최근 식품산업계에서 추출분리, 분획 및 살균 등의 식품가공기술에 초임계 유체의 사용이 증가하고 있는 추세이다. 특히 용매로써 무독성, 친환경 등의 장점을 가진 이산화탄소를 주로 사용하고 있으며, 초임계 이산화탄소 처리에 의해 단백질의 구조적 변화에도 영향을 미친다고 알려져 있어(Winters et al., 1996; Xu et al., 2011), 그 응용 범위가 넓어지고 있다. Winters 등(1996)은 trypsin, lysozyme, insulin 단백질의 마이크로 분말화 과정에서 초임계 이산화탄소를 반응매로 사용하였을 때, 단백질의 2차 구조가 변하였다고 보고하였다. 또한 Xu 등(2011)의 연구에 의하면 20 MPa, 30-60℃의 조건으로 초임계 이산화탄소 처리를 하였을 때, 유청단백질의 2차 구조가 변화되었다고 하였다. 이러한 단백질 변화는 항원성의 변화를 야기하기도 하는데, 알레르기 억제를 위한 물리적 처리로 초임계 이산화탄소를 이용한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 밀 알레르기 억제를 위한 방법을 찾기 위해 밀가루에 200 bar 60℃ 5시간, 250 bar 60℃ 5시간, 250 bar 60℃ 12시간의 조건으로 초임계 이산화탄소 처리를 한 뒤, gliadin을 추출하였다. 추출액을 이용하여 gliadin에 대한 항원성 변화를 알아보기 위해 Ci-ELISA를 실시하였다. 그 결과(Fig. 3), 모든 처리구에서 무처리구와 같이 높은 결합력을 유지하였으며, 처리 압력과 시간에 따른 차이도 보이지 않아 초임계 이산화탄소 처리와 다른 물리적 처리 병행에 의한 항원성의 변화에 대해 알아보고자 하였다. 따라

서 본 실험에서는 200 bar 60℃ 5시간의 조건으로 초임계 이산화탄소를 처리한 뒤 밀가루와 반죽을 이용하여 다른 물리적 처리를 병행하여 실험을 진행하였다.



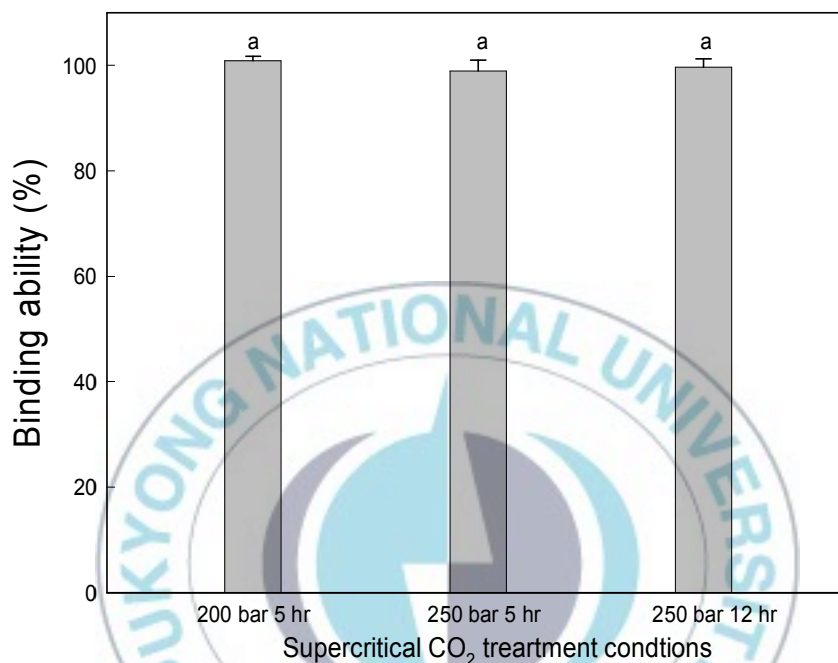


Fig. 3. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂, Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour non-treated.

2-2. 초임계 이산화탄소와 감마선 병행 처리에 의한 변화

감마선 조사에 의한 밀가루 및 밀반죽의 항원성 및 단백질 변화를 알아보기 위해 초임계 이산화탄소 처리한 밀가루 및 밀반죽을 각각 1, 5, 10 및 20 kGy의 선량으로 감마선 조사하였다. 감마선 조사한 밀가루 및 밀반죽 gliadin과 anti-gliadin IgG 항체와의 결합력을 Ci-ELISA를 통해 알아본 결과(Fig. 4, 5), 밀가루와 반죽 모두 무처리구와 비슷하게 높은 결합력을 유지하였다. 감마선 조사한 밀가루 및 밀반죽 gliadin(분자량, 약 14-50 kDa) 단백질 변화를 알아보기 위해 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과, 전체적으로 큰 변화를 보이지는 않았고 밀가루의 경우 약 14 및 30 kDa 부근, 반죽의 경우 약 14, 20 및 30 kDa 부근 gliadin 단백질 band의 강도가 다소 약해졌으며, 특히 20 kGy 처리구에서는 약 14 kDa 부근 단백질 band의 굵기도 감소한 것으로 나타났다(Fig. 6, 7).

식품조사에서 방사선은 살균, 살충, 발아억제 및 환자용 무균 식품, 장기보관용 군용식품, 우주식품 등의 특수목적 식품 등에 다양하게 이용되고 있다(Kwon, 1997). 방사선의 종류로는 감마선, 전자선, X선 등이 있으며, 그 중에서도 감마선이 주로 이용되고 있다. 방사선 에너지는 대부분 식품을 통과하지만 일부는 분자에 의해 흡수 또는 산란되어 자유 radical을 생성한다. 이 radical이 단백질을 공격하여 단백질의 2, 3, 4차 구조 변화가 일어나는데, 방사선에 의한 단백질 변성은 주로 단백질 응집으로 인한 중합이 많이 발생한다(Lee et al., 2003).

최근 이러한 감마선 조사 기술이 식품의 항원성을 감소시키는데 이용되고 있으며, 감마선 조사에 의해 식품 항원의 구조적 변화에 의한

epitope 파괴로 항원성이 감소된다는 연구결과가 많이 보고되고 있다 (Shin et al., 2008; Li et al., 2007; Lee et al., 2001). 반면 감마선 조사에 의해 오히려 항원성이 증가한다는 연구 결과도 있었는데, Leszczynska 등(2003)은 gliadin과 밀가루에 2.2-12.7 kGy의 감마선 조사가 오히려 ω -gliadin과 항체와의 결합력을 증가시켰다고 하였다. 이는 감마선 조사시 생성된 radical에 의해 유발된 밀가루의 다른 성분과 gliadin의 교차반응에 의한 것이라고 설명하였다. 본 실험에서는 감마선 조사에 의해 일부 gliadin 단백질 band의 강도가 약간 감소하였으나 항원성이 변화되지 않은 것으로 보아 밀가루나 밀반죽에 감마선 직접 조사는 gliadin 단백질의 항원성 감소에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.



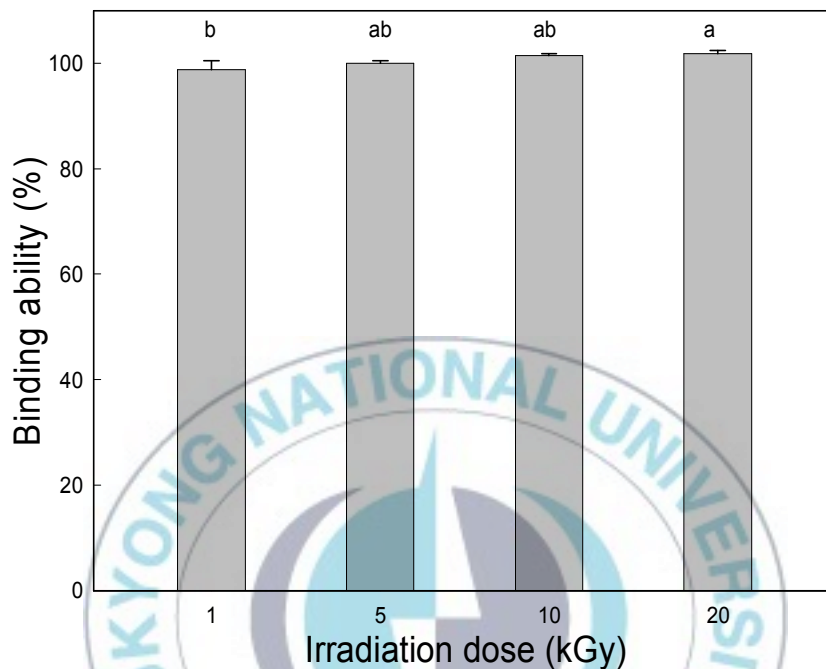


Fig. 4. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and gamma irradiation. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and gamma irradiation, Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour non-treated.

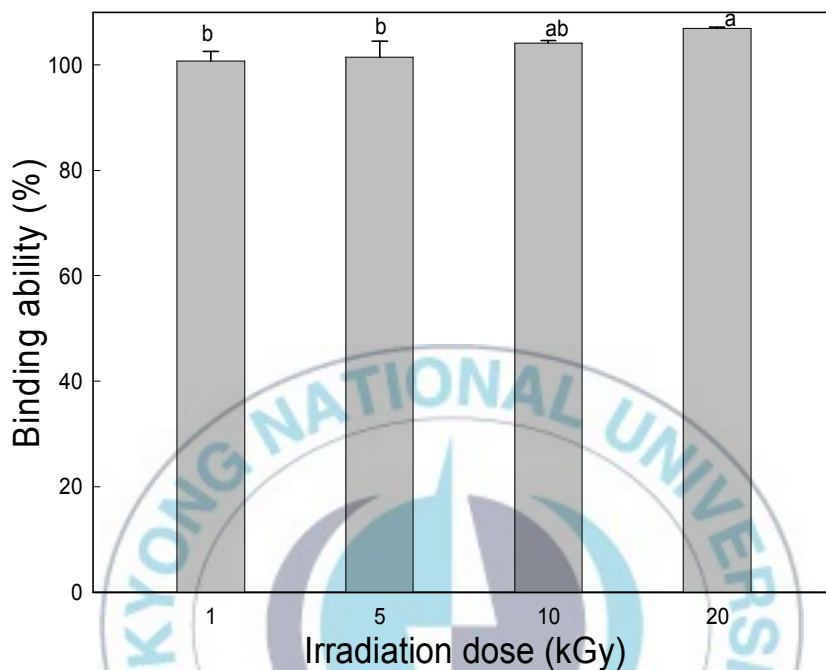


Fig. 5. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂ and gamma irradiation. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂ and gamma irradiation, Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough non-treated.

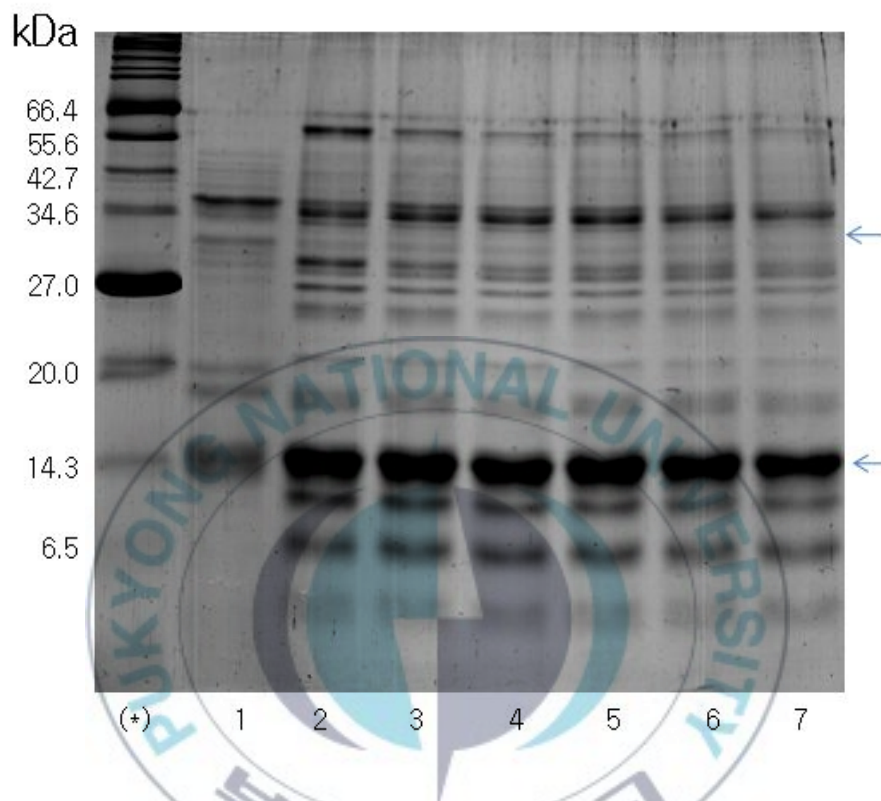


Fig. 6. SDS-PAGE of wheat flour extracts treated with supercritical CO₂ and gamma irradiation. Samples are (*) protein marker, (1) gliadin, (2) untreated, (3) supercritical CO₂ treated, (4) 1 kGy, (5) 5 kGy, (6) 10 kGy, (7) 20 kGy.



Fig. 7. SDS-PAGE of wheat dough extracts treated with supercritical CO₂ and gamma irradiation. Samples are (*) protein marker, (1) gluten, (2) gliadin, (3) untreated, (4) supercritical CO₂ treated, (5) 1 kGy, (6) 5 kGy, (7) 10 kGy, (8) 20 kGy.

2-3. 초임계 이산화탄소와 초고압 병행 처리에 의한 변화

식품 가공에 있어서 초고압 처리는 압력의 potential을 이용하는 방법으로, 높은 정수압(high hydrostatic pressure)하에서 나타나는 식품의 물리적, 생화학적 변화를 이용하는 것이다. 식품에 대한 압력 처리는 미생물의 사멸, 효소의 불활성화, 단백질의 젤화 및 전분의 호화 등과 같은 현상을 가져온다. 특히 고압처리에 의해 단백질은 입체구조가 붕괴되어 독특한 젤을 형성하고, 분자의 소수성 또는 이온결합을 분해시켜 단백질의 구조가 풀어지면서 단백질의 부피도 감소한다(Son, 1997).

따라서 이러한 단백질 변화를 이용하여 최근에는 알레르기 유발 식품의 항원성 변화를 위해 고압 기술을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. Yamamoto 등(2010)은 wheat α -amylase inhibitor에 대한 고압 처리에 의해 IgE와의 반응성이 감소되었다고 보고하였으며, 한 등(2006)에 의해서도 우유추출물 중의 BGG 단백질이 초고압 처리에 의해 전기영동상 band가 감소하였고, 항원성 역시 감소한 것을 알 수 있었다. 한편, celery 알레르겐인 rApi g1에 대한 고압 처리에서는 단백질 구조의 변화가 관찰되었으나, 항원성에는 큰 변화가 없었다(Houska et al., 2009).

본 연구에서는 초임계 이산화탄소 처리한 밀가루 및 밀반죽에 각각 100, 300 및 500 MPa의 정수압을 이용하여 3분간 초고압 처리한 뒤 gliadin의 항원성 및 단백질 변화를 살펴보았다. Ci-ELISA 결과(Fig. 8, 9), 밀가루와 밀반죽 모두 처리구에서 높은 결합력을 유지한 것으로 나타나 500 MPa까지의 초고압 처리에 의해서도 gliadin의 항원성

감소에는 큰 효과가 없는 것을 알 수 있었다. 또한 초고압 처리한 밀가루 및 밀반죽의 gliadin(분자량, 약 14-50 kDa) 단백질 변화를 알아보기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과(Fig. 10, 11), 밀가루에 500 MPa으로 초고압 처리하였을 때, 약 14 kDa 부근 단백질의 굵기가 약간 감소하였고, 그 외 gliadin 단백질들은 무처리구와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 밀반죽의 경우에도 전체적으로 무처리구와 비교하여 큰 차이가 나타나지 않았다. 이상의 결과를 통해 100, 300 및 500 MPa의 초고압 처리는 밀가루 및 밀반죽의 항원성 변화에 큰 효과를 보이지 않는 것을 알 수 있었다.



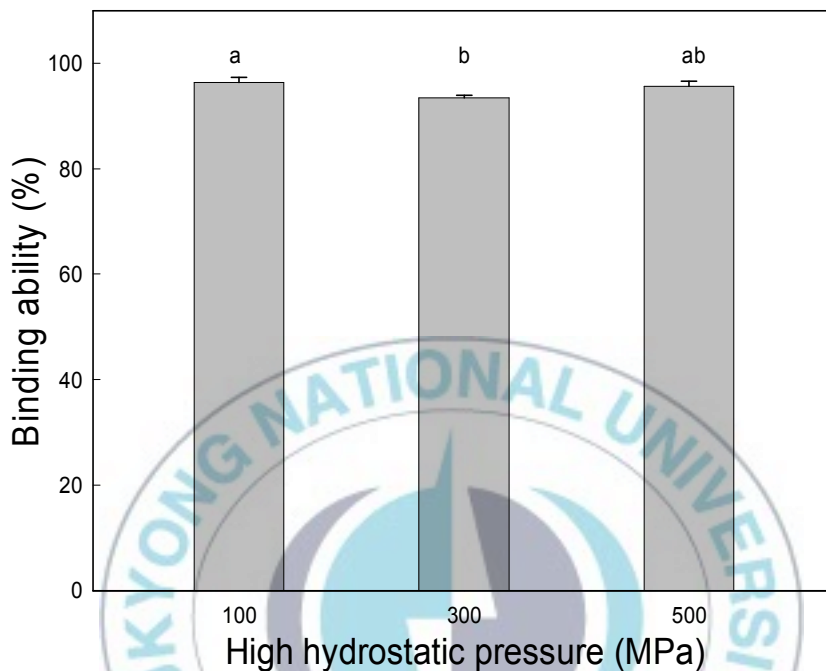


Fig. 8. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and high hydrostatic pressure(HHP). The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and HHP, Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour non-treated.

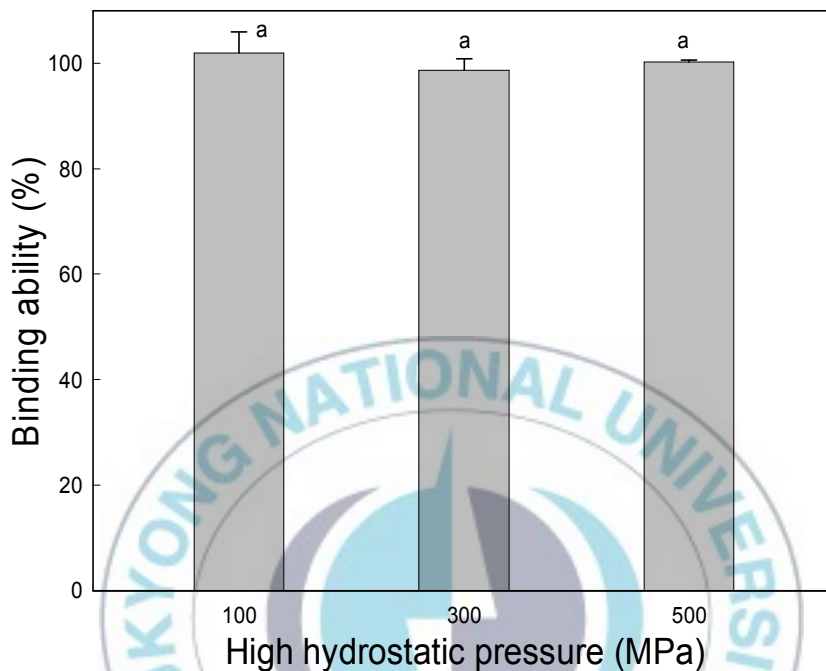


Fig. 9. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂ and high hydrostatic pressure(HHP). The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and HHP, Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough non-treated.

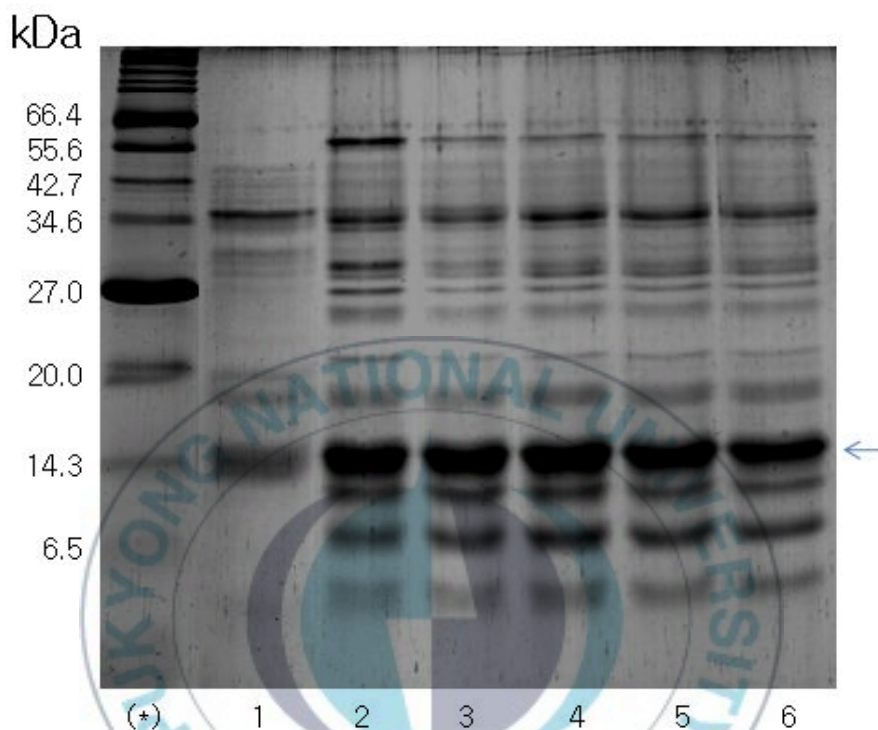


Fig. 10. SDS-PAGE of wheat flour extracts treated with supercritical CO₂ and high hydrostatic pressure(HHP). Samples are (*) protein marker, (1) gliadin, (2) untreated, (3) supercritical CO₂ treated, (4) 100 MPa, (5) 300 MPa, (6) 500 MPa.

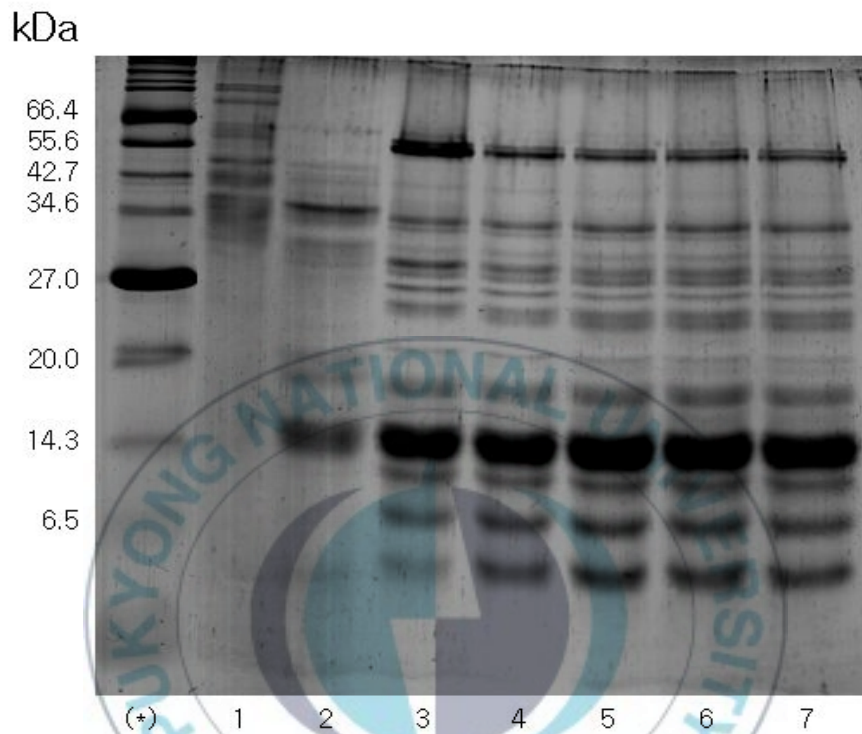


Fig. 11. SDS-PAGE of wheat dough extracts treated with supercritical CO₂ and high hydrostatic pressure(HHP). Samples are (*) protein marker, (1) gluten, (2) gliadin, (3) untreated, (4) supercritical CO₂ treated, (5) 100 MPa, (6) 300 MPa, (7) 500 MPa.

2-4. 초임계 이산화탄소와 가압가열 병행 처리에 의한 변화

식품 가공 중에 가장 많이 사용되는 열처리는 식품의 조리뿐만 아니라 안전성이나 저장성을 증진시키기 위해서도 사용되는데, 단백질 변성을 유도함으로써 식품의 항원성 변화를 초래하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2006). 땅콩에 대한 열처리의 경우, boiling에 의해 항원성이 감소되었고, roasting에 의해 땅콩 알레르기 환자의 IgE와 정제된 알레르겐과의 결합력이 증가한 것으로 나타났다(Mondoulet et al., 2005). Shibata 등(2008)의 연구에서는 가압가열 처리에 의해 대두 단백질의 변성이 일어났지만 항원성은 그대로 남아있었고, lupine flour의 경우 138℃에서 20분간 가압가열 처리하였을 때, 항원성이 감소되었다(Álvarez-Álvarez et al., 2005). 또한 Varjonen 등(1996)은 RAST test를 통해서 80, 100 및 120℃에서 10, 20 및 60분간 가압가열 처리한 뒤 산성, 중성 추출한 밀가루 단백질의 항원성이 감소되었다고 보고하였다.

밀은 베이킹, 쿡킹 등과 같은 고온의 열처리가 없이는 소비되지 않는 전형적인 식품 중의 하나이다. 그러나 밀 알레르기 환자들이 밀 가공제품 섭취 후에도 알레르기 반응을 일으킨다는 것은 오븐과 같은 고온의 열처리에 의해서도 항원성이 그대로 남아있다는 증거이다. 따라서 이를 저감화시키기 위해 가압가열 처리와 같은 다른 가공 처리 방법의 필요성이 대두되고 있다. 본 실험에서는 초임계 이산화탄소 처리한 밀가루와 밀반죽 gliadin의 가압가열 처리에 의한 항원성 변화를 알아보기 위하여 밀가루와 밀반죽을 게이지압 1 kg/cm², 121℃에서 5, 10, 30 및 50분간 가압가열 처리한 후 Ci-ELISA를 실시하였다.

그 결과(Fig. 12), 밀가루의 경우, 가압가열 30분 이상 처리시 gliadin과 anti-gliadin IgG 항체와의 결합력이 다소 감소하는 경향을 보였고, 특히 50분 처리구에서 약 89%의 결합력을 보였다. 밀반죽의 경우(Fig. 13), 모든 처리구에서 항체와의 결합력이 40% 이하로 감소하였으며, 가압가열 30분 처리시 14% 정도로 가장 낮은 결합력을 보였다.

또한 가압가열 처리한 밀가루 및 밀반죽의 gliadin(분자량, 약 14-50 kDa) 단백질 변화를 알아보기 위해 SDS-PAGE를 실시하였다. 밀가루에 대한 SDS-PAGE 결과(Fig. 14), 초임계 이산화탄소를 처리한 경우 무처리구와 비교하여 큰 차이가 없었지만 가압가열을 병행 처리시 전체적으로 gliadin 단백질 band의 강도가 약화된 것을 알 수 있었다. 특히 약 14 및 20 kDa 부근의 단백질은 30 및 50분 처리구에서, 약 35 kDa 부근의 단백질은 50분 처리구에서 band의 강도가 약해진 것을 알 수 있었다. Fig. 22, b의 결과를 비추어 볼 때, 50분 처리구는 약 35 kDa 부근의 gliadin 단백질이 가압가열에 더욱더 영향을 받아 가장 낮은 결합력을 보인 것으로 사료된다. 가압가열 처리한 반죽의 gliadin 단백질 변화를 SDS-PAGE를 통해 측정한 결과(Fig. 15), 가압가열 병행 처리시 gliadin 단백질이 상당히 소실된 것으로 관찰되었다. 특히 약 35 kDa의 단백질이 가압가열 처리에 의해 영향을 받아 반죽 gliadin의 항원성이 감소한 것으로 판단된다.

Rumbo 등(2001)이 보고한 연구결과에 의하면 3B4H1 mAb와 anti gliadin serum과 gliadin의 결합력이 밀가루의 경우, α -, β -, γ - 및 ω -gliadin fraction에 대해 100℃, 20분 가열처리시 70%정도로 항원성이 감소되었다. 또한 100, 130 및 160℃에서 20분간 가열 처리한 밀

반죽의 경우, 열처리한 밀반죽에서 단백질 용출도가 감소되었으며, 3B4H1 mAb, anti gliadin serum과 gliadin과의 결합력이 모두 온도가 높아질수록 낮아지는 경향을 나타내었다. 이러한 밀반죽 gliadin의 항원성 감소는 열처리로 인한 gliadin 용출의 감소 및 단백질 구조 변화에 의한 결과라고 하였다.

한편, α -, β -, γ -gliadin은 황을 많이 함유하고 있으며, thioredoxin 처리로 인한 S-S결합 파괴로 gliadin의 항원성이 감소되었다는 연구가 보고되어 있다(Waga et al., 2008). 단백질의 S-S결합은 고온 처리에 변화되기도 하는데, Schofield 등(1983)에 의하면 열처리는 sulfur-rich gliadin에서 분자 사이의 결합을 촉진시키고, disulfide-sulfhydryl간의 상호교환을 증가시킨다고 하였다. 또한 대두 단백질(Shimada et al., 1988), 유청단백질(Shimada et al., 1989) 및 Bovine Serum Albumin(Steinrauf et al., 1958) 등에서 가열 처리에 의해 disulfide bond가 변화되었다고 보고하고 있다. 따라서 본 실험에서는 가압가열 처리시 gliadin 단백질의 S-S결합 변화로 인해 항원성이 다소 감소된 것으로 예상된다.

이상의 결과를 종합해볼 때, 밀가루의 경우 gliadin 단백질이 가압가열 처리에 의해 분해되었으나 항원-항체 결합력에 영향을 미치는 약 35 kDa 단백질에는 크게 작용하지 않아 결합력이 감소하는 경향을 보이지 않았으나 높게 유지되었다. 반면 반죽의 경우 약 35 kDa 부근의 단백질 또한 소실이 되어 결합력이 감소한 것으로 사료된다.

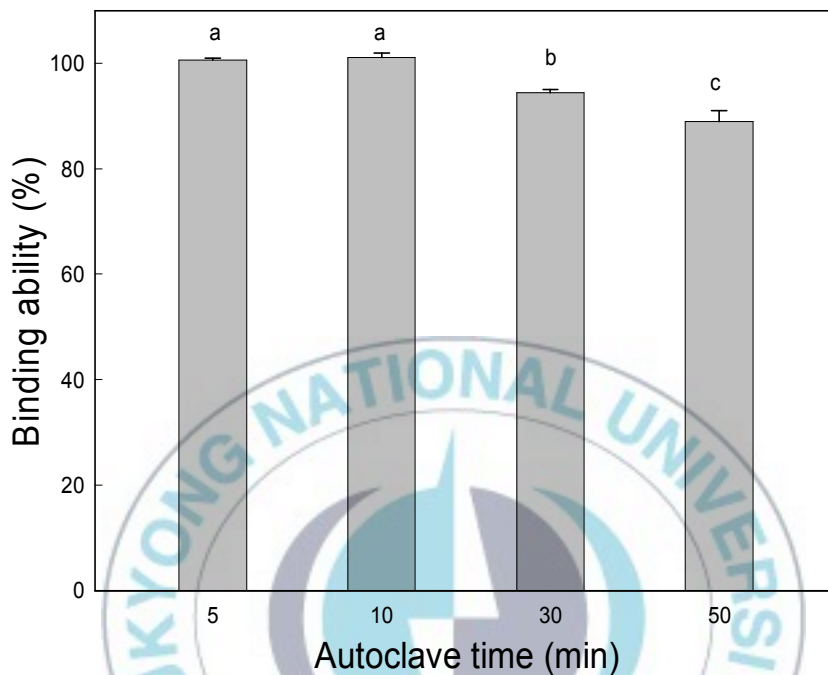


Fig. 12. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and autoclave. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and autoclave. Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour non-treated.

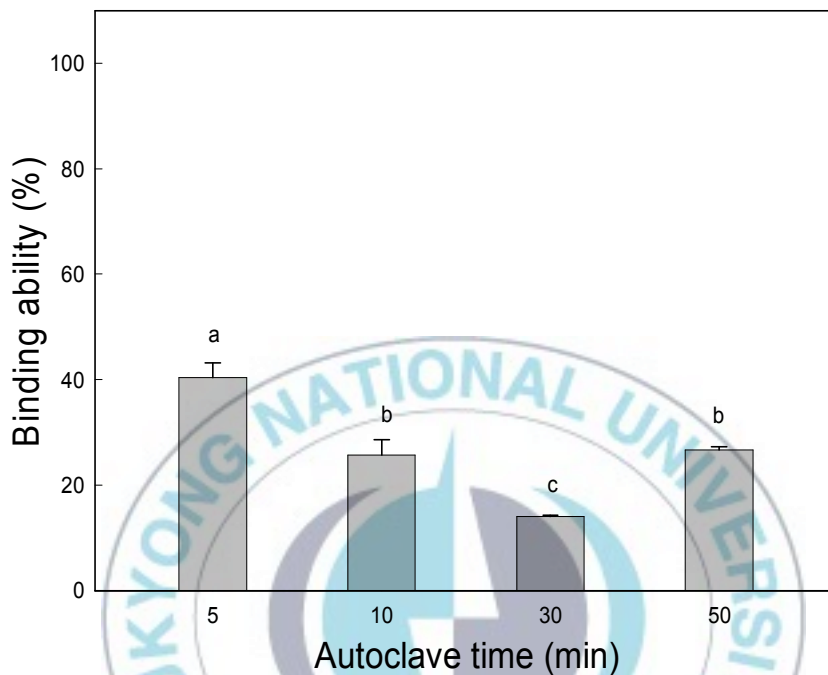


Fig. 13. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂ and autoclave. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂ and autoclave. Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough non-treated.

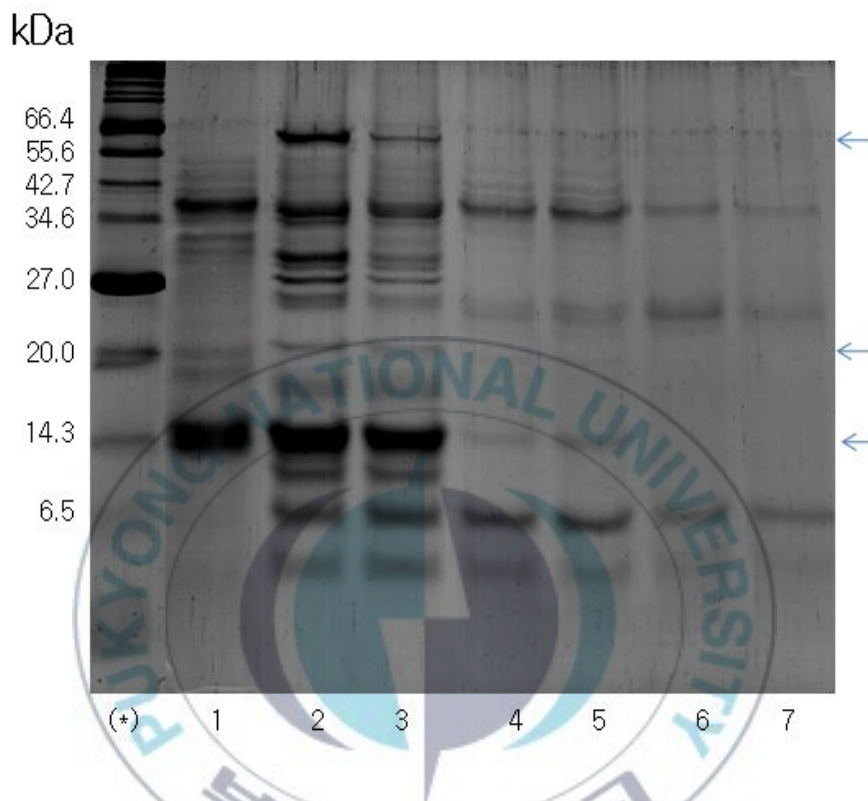


Fig. 14. SDS-PAGE of wheat flour extracts treated with supercritical CO₂ and autoclave. Samples are (*) protein marker, (1) gliadin, (2) untreated, (3) supercritical CO₂ treated, (4) 5 min, (5) 10 min, (6) 30 min, (7) 50 min.

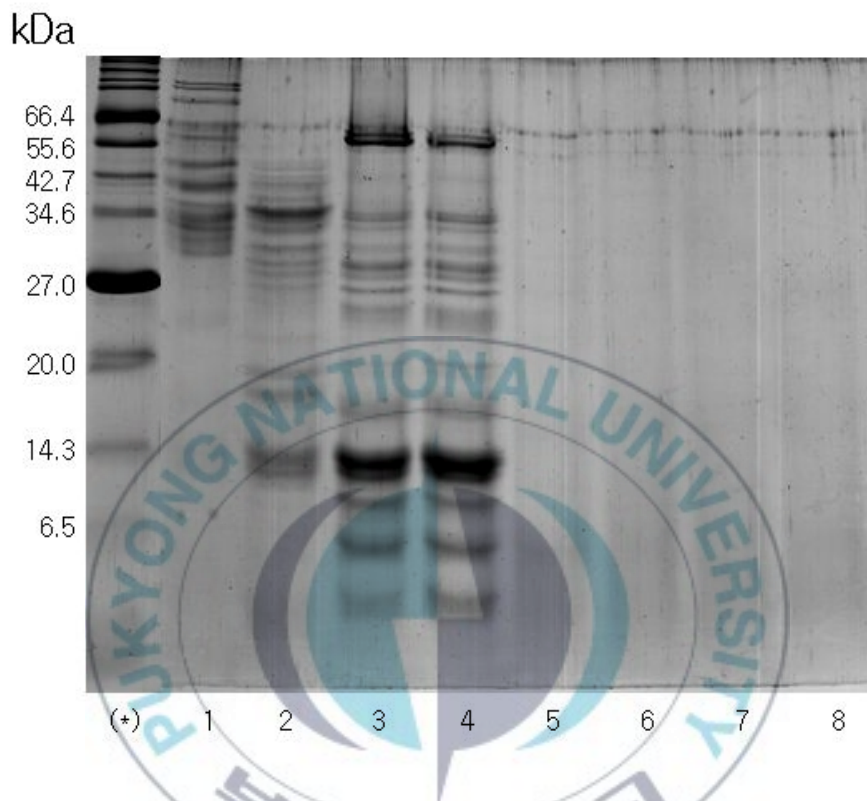


Fig. 15. SDS-PAGE of wheat dough extracts treated with supercritical CO₂ and autoclave. Samples are (*) protein marker, (1) gluten, (2) gliadin, (3) untreated, (4) supercritical CO₂ treated, (5) 5 min, (6) 10 min, (7) 30 min, (8) 50 min.

2-5. 초임계 이산화탄소와 microwave 병행 처리에 의한 변화

초임계 이산화탄소 처리한 밀가루 및 밀반죽을 1, 5 및 10분간 microwave 처리한 후, Ci-ELISA를 실시하여 gliadin에 대한 anti-gliadin IgG와의 결합력을 알아보았다. 밀가루와 반죽 모두 microwave 처리구에서 gliadin과 항체와의 결합력이 무처리구와 비슷하게 높게 유지되어 항원성 감소에는 큰 효과가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 16, 17).

밀 gliadin(분자량, 약 14-50 kDa)의 단백질 변화 정도를 알아보기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과(Fig. 18, 19), 밀가루의 경우, 초임계 이산화탄소 처리구와 microwave 병행 처리구 모두 무처리구와 비교하여 단백질 band에 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 하지만 반죽의 경우, microwave 1분 처리구에서는 무처리구와 비교하여 큰 변화가 없는 반면에 5 및 10분 처리구에서는 약 14, 27 및 30 kDa 부근의 단백질 band의 강도가 약해졌으나 약 35 kDa의 band는 큰 변화를 나타내지 않았다.

Microwave는 단시간에 조사물체의 온도를 높일 수가 있기 때문에 식품의 조리, 건조, 해동 및 가공에 널리 이용되고 있다. 식품이나 물은 microwave를 흡수하며, 흡수된 에너지는 식품 중의 물이나 다른 쌍극자 물질들의 극성 회전운동이나 이온성 성분들의 전도현상에 의해 열에너지로 바뀌게 되어 가열현상이 일어난다(Mullin, 1995). 이러한 열처리와 분자간의 상호운동에 따라 단백질의 구조도 변화하게 된다. 따라서 최근에는 식품의 항원성을 감소시키기 위한 물리적 처리 방법 중의 하나로 microwave를 사용하고 있다. Venkatachalam 등(2002)

의 연구에서는 microwave 3분 처리에 의해 아몬드 단백질의 항원성이 감소되었고, 우유단백질에서도 microwave에 의한 단백질 구조 변화로 인한 항원성이 감소되었다고 하였다(Hanane et al., 2006). 반면 lupine flour의 경우, microwave 처리 후에도 항원성에 큰 변화가 없었으며(Álvarez-Álvarez et al., 2005), Leszczynska 등(2003)의 연구에서는 gliadin과 밀가루에 대한 70, 200 및 500 W의 전력으로 1, 2, 3 및 5분간 microwave 처리가 오히려 항원성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 이는 microwave 열처리에 의해 gliadin 단백질의 구조가 항체와 더 잘 결합할 수 있는 구조로 변했기 때문이라고 하였다. 이와 같이 식품의 종류에 따라 다른 양상을 보이는 것은 항원에 따라 단백질의 구조 및 열 안정성에 대한 특징이 다르기 때문에 microwave 열처리에 대한 감수성이 다르게 나타나기 때문이라고 생각된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 실험에서는 밀반죽에 700 W의 전력으로 microwave를 5 및 10분 처리시 gliadin 단백질의 변화가 일어났으나 Fig. 22, b의 결과를 비추어 항원성 변화와 가장 관계되어 있는 것으로 예상되는 약 35 kDa에 해당하는 단백질에는 microwave의 작용이 미치지 않아 항원성에는 큰 변화를 보이지 않은 것으로 생각된다.

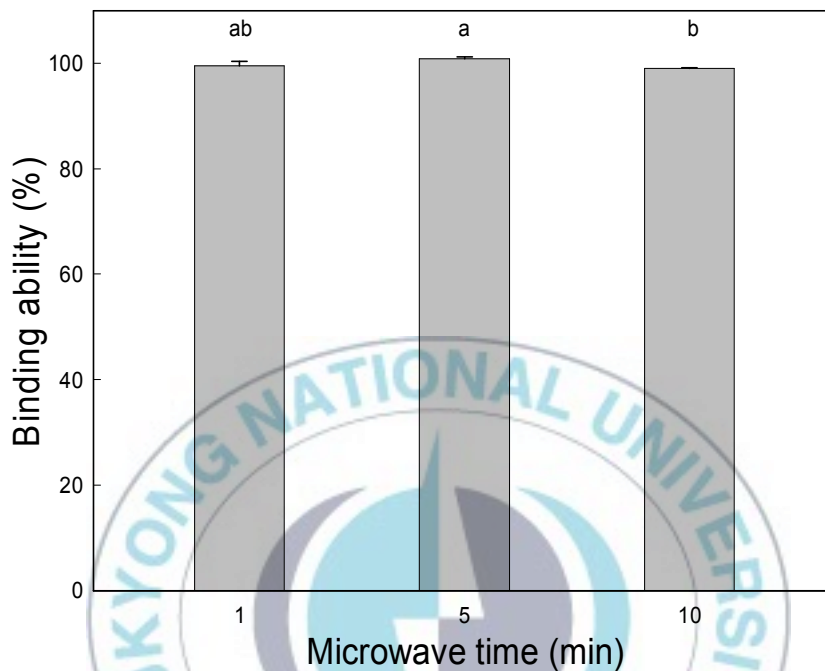


Fig. 16. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and microwave. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂ and microwave. Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour non-treated.

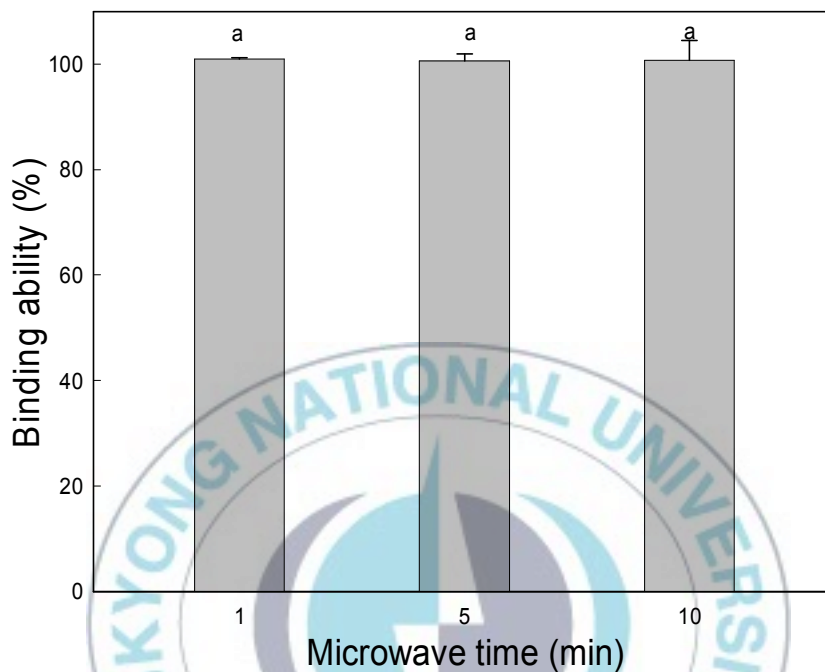


Fig. 17. Binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂ and microwave. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability= $B_t/B_o \times 100$. B_t; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂ and microwave. B_o; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough non-treated.

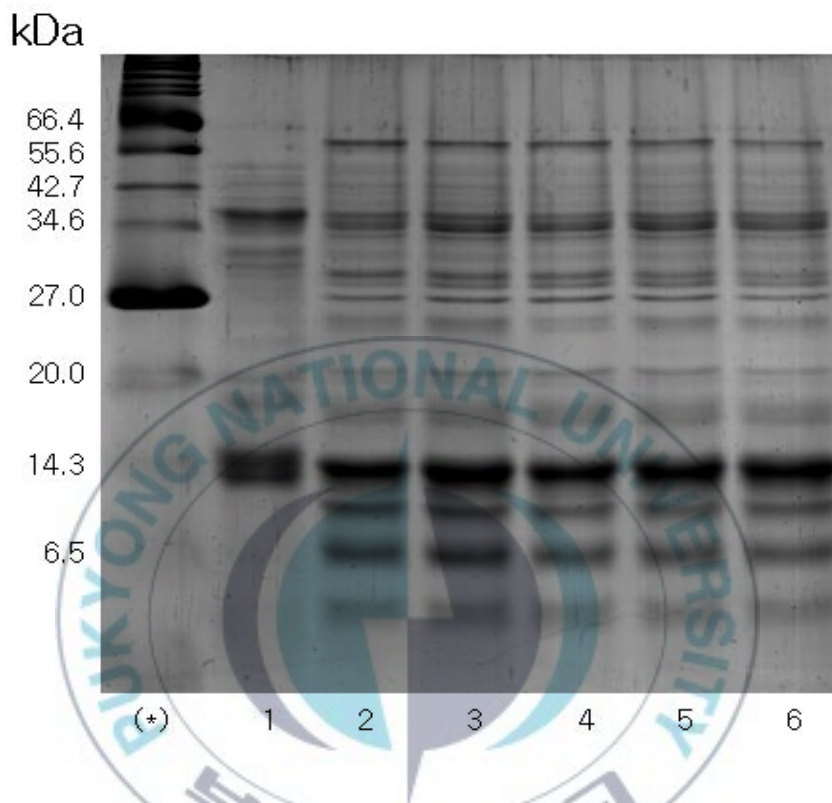


Fig. 18. SDS-PAGE of wheat flour extracts treated with supercritical CO₂ and microwave. Samples are (*) protein marker, (1) gliadin, (2) untreated, (3) supercritical CO₂ treated, (4) 1 min, (5) 5 min, (6) 10 min.

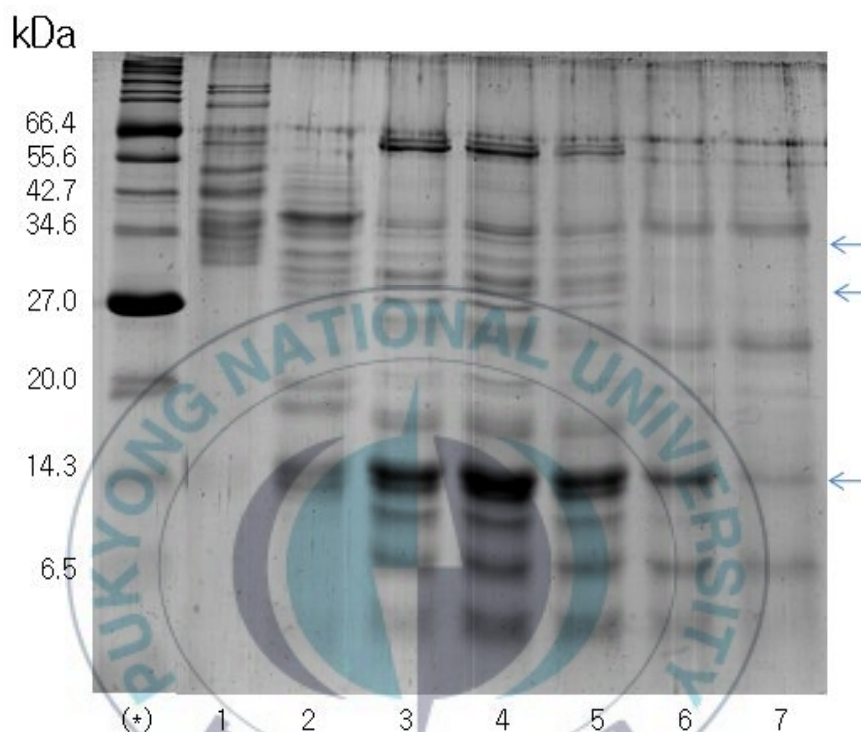


Fig. 19. SDS-PAGE of wheat dough extracts treated with supercritical CO₂ and microwave. Samples are (*) protein marker, (1) gluten, (2) gliadin, (3) untreated, (4) supercritical CO₂ treated, (5) 1 min, (6) 5 min, (7) 10 min.

2-6. 초임계 이산화탄소, 가압가열 및 microwave 병행 처리에 의한 변화

최근에는 두가지 이상의 물리적 방법을 병행 처리하거나 물리적, 화학적 방법을 병행 처리하여 항원성 변화에 대해 살펴본 연구가 보고되고 있다(Kim et al., 2002; Izquierdo et al, 2008; Grar et al., 2009; Bonomia et al., 2000). 따라서 본 연구에서는 감마선, 초고압, 가압가열 및 microwave 처리 중에 gliadin의 항원성 감소 및 단백질의 변화가 관찰된 가압가열과 microwave를 병행 처리한 뒤 항원성 및 단백질 변화를 살펴보았다. 초임계 이산화탄소 처리한 밀가루 및 밀반죽을 각각 121℃에서 10, 30, 50분 가압가열 처리 직후 5, 10분간 microwave를 처리하였으며, 그 결과를 Fig. 20 및 21에 나타내었다.

밀가루 gliadin의 항원성 변화를 살펴보기 위해 Ci-ELISA를 실시한 결과, 모든 처리구에서 결합력이 약간 감소하였으며 가압가열 처리 시간이 길어질수록 결합력이 감소하는 경향을 보였다. 특히 가압가열 50분과 microwave 5분 처리시 항원과 항체와의 결합력이 무처리구가 100%인 것에 비해 약 84% 정도로 항원성이 감소된 것을 확인하였다. 초임계 이산화탄소 처리한 밀가루를 이용하여 반죽한 후, 가압가열과 microwave를 병행 처리하였을 때, 모든 처리구에서 30% 이하의 결합력을 보였으며, 특히 가압가열 30분, microwave 5분 처리시 약 10%로 가장 낮은 결합력을 보였다. 또한 같은 조건의 가압가열 처리시 microwave 시간이 짧을 때 더 낮은 결합력을 보인 것으로 나타났다.

밀가루 추출액 중 약 14-50 kDa 사이의 gliadin 단백질 변화를 알아

보기 위한 SDS-PAGE 결과(Fig. 22, a), 가압가열 처리 시간이 증가될수록 단백질 band가 전체적으로 약화되었으며, 특히 가압가열을 50분 처리하였을 때 단백질 band가 가장 많이 소실되었다. 특히 약 35 kDa에 해당하는 단백질은 가압가열 10분 및 30분 처리구에서는 변화가 없었으나, 50분 처리구에서 band의 강도가 약간 감소되었다. 또한 Ci-ELISA와 SDS-PAGE 결과, 약 35 kDa 부근의 단백질 band의 강도가 약해졌을 때, ELISA에서 항체와의 결합력이 감소되어 두 실험 결과가 일치하는 경향을 보였다. 반죽의 경우, 가압가열과 microwave 병행 처리에 의해 전체적으로 단백질의 소실이 관찰되었다(Fig. 23, a). Gliadin band와 항체와의 결합 유무를 판단하기 위해 SDS-PAGE 후, immunoblotting을 실시하였다. 밀가루의 경우, gliadin 단백질 중 약 35 kDa에 해당하는 단백질이 처리 후에도 IgG와 반응하여 이 단백질의 구조변화가 gliadin의 항원성 변화에 큰 영향을 주는 것으로 판단된다(Fig. 22, b). 또한 반죽의 경우, 약 35 kDa 부근의 단백질도 모두 소실되어 immunoblotting에서도 항체와 결합하지 않은 것으로 보인다(Fig. 23, b).

Native-PAGE를 통해 단백질 변화를 측정한 결과, 밀가루의 경우(Fig. 24), 무처리구와 초임계 이산화탄소 처리구에서 단백질 band를 확인하였으며, 초임계 이산화탄소 처리시, 전기적 이동 속도가 가장 빠른 부분의 단백질 band(gel의 아래 부분)의 강도가 약해지고 고분자의 새로운 band가 생성되었다. 또한 가압가열 10분 처리시 확연한 단백질의 변성이 나타났으며, 여러개의 새로운 고분자 band가 관찰되어 단백질의 중합이 일어난 것으로 생각된다. 반면 가압가열 30 및 50분

처리시에는 microwave 처리 시간과 관계없이 단백질이 거의 관찰되지 않아 중합되었던 단백질이 분해된 것으로 생각된다. 반죽의 경우 (Fig. 25), 무처리구에 비해 초임계 이산화탄소 처리구에서는 전기적 이동도가 큰 부분의 단백질 band의 강도가 약해졌으며, 가압가열과 microwave 처리구에서는 단백질이 관찰되지 않았다. 단백질은 고온처리에 의해 분자사이의 결합, 소수성 작용 등에 의하여 polymer 형태로 중합이 일어나기도 하며, S-S결합 등의 파괴로 인해 분해되기도 한다(Restani et al., 2004; Schofield et al., 1983). 따라서 본 연구 결과, 가압가열과 microwave를 연속적으로 처리함으로써 단백질이 분해되어 나타나지 않았거나 중합되어 용출이 되지 않은 것으로 예상된다.

이상의 결과를 종합해볼 때, 밀가루 및 밀반죽에 대해 가압가열 및 microwave 병행 처리시에 약 35 kDa의 단백질이 영향을 받아 gliadin의 항원성이 감소한 것으로 사료되며, 반죽에 단독으로 가압가열과 microwave를 처리하는 경우보다 병행 처리시 반죽의 gliadin 항원성 감소에 더욱 효과적인 것을 확인하였다.

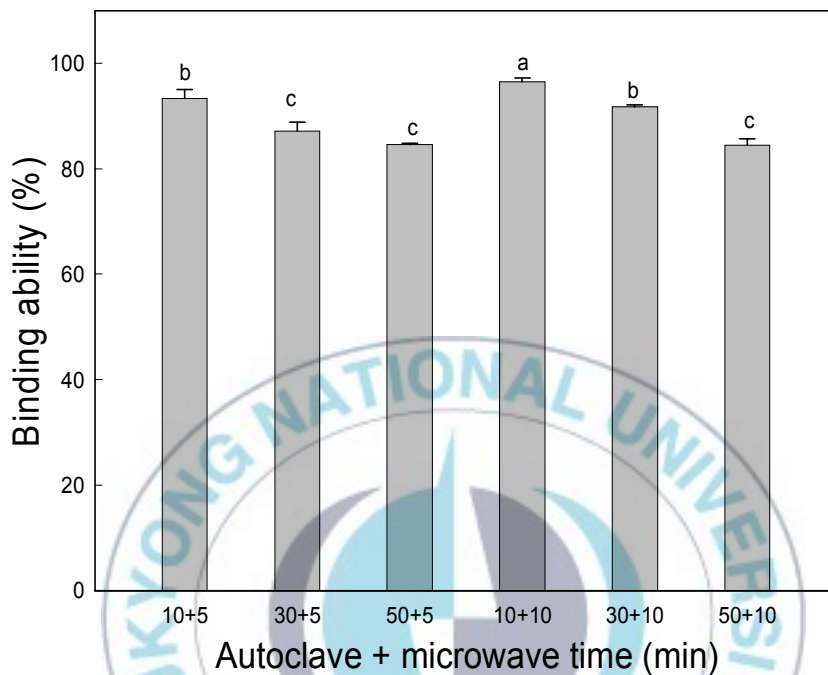


Fig. 20. Binding ability of anti- to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂, autoclave and microwave. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour treated with supercritical CO₂, autoclave and microwave. Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat flour non-treated.

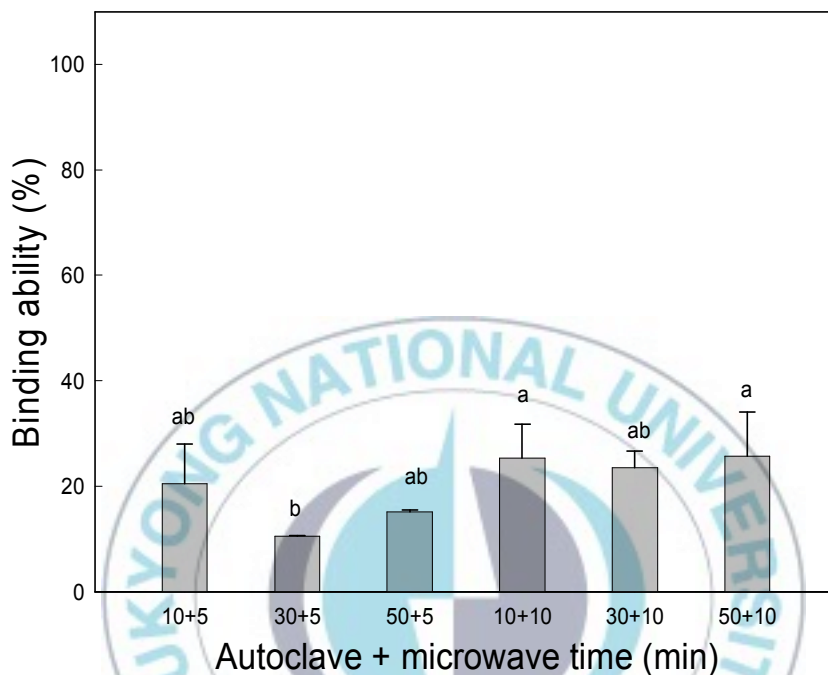


Fig. 21. Binding ability of anti- to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂, autoclave and microwave. The binding ability was measured by Ci-ELISA. Binding ability=Bt/Bo x 100. Bt; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough treated with supercritical CO₂, autoclave and microwave. Bo; binding ability of anti-gliadin IgG to gliadin in wheat dough non-treated.

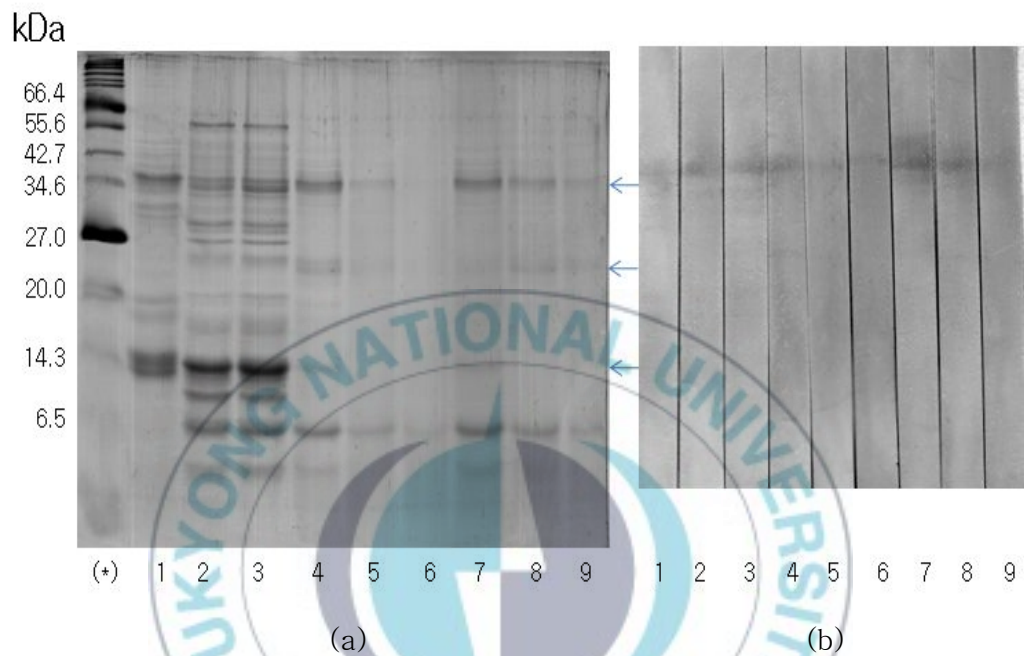


Fig. 22. SDS-PAGE(a) and immunoblotting(b) of wheat flour extracts treated with supercritical CO₂, autoclave and microwave. Samples are (*) protein marker, (1) gliadin, (2) untreated, (3) supercritical CO₂ treated, (4) 10+ 5 min, (5) 30+ 5 min, (6) 50+ 5 min, (7) 10+ 10 min, (8) 30+ 10 min, (9) 50+ 10 min.

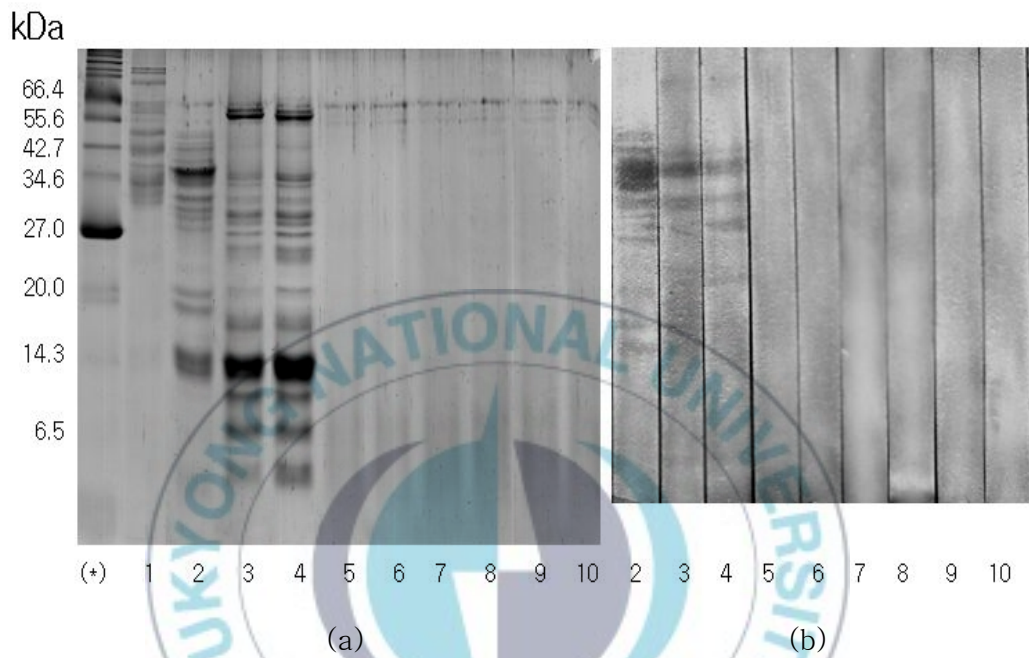


Fig. 23. SDS-PAGE(a) and immunoblotting(b) of wheat dough extracts treated with supercritical CO₂, autoclave and microwave. Samples are (*) protein marker, (1) gluten, (2) gliadin, (3) untreated, (4) supercritical CO₂ treated, (5) 10+5 min, (6) 30+5 min, (7) 50+5 min, (8) 10+10 min, (9) 30+10 min, (10) 50+10 min.

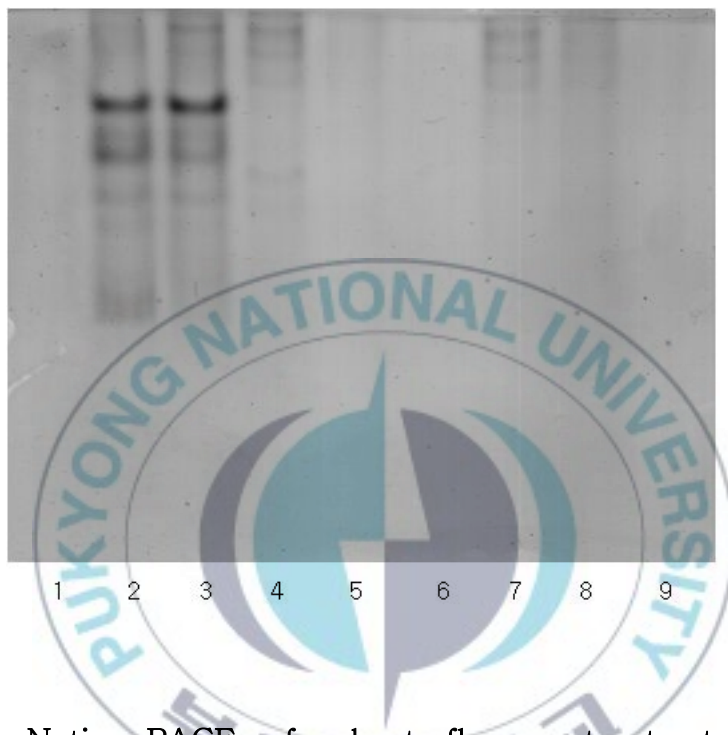


Fig. 24. Native-PAGE of wheat flour extracts treated with supercritical CO₂, autoclave and microwave. Samples are (1) gliadin, (2) untreated, (3) supercritical CO₂ treated, (4) 10+ 5 min, (5) 30+ 5 min, (6) 50+ 5 min, (7) 10+ 10 min, (8) 30+ 10 min, (9) 50+ 10 min.

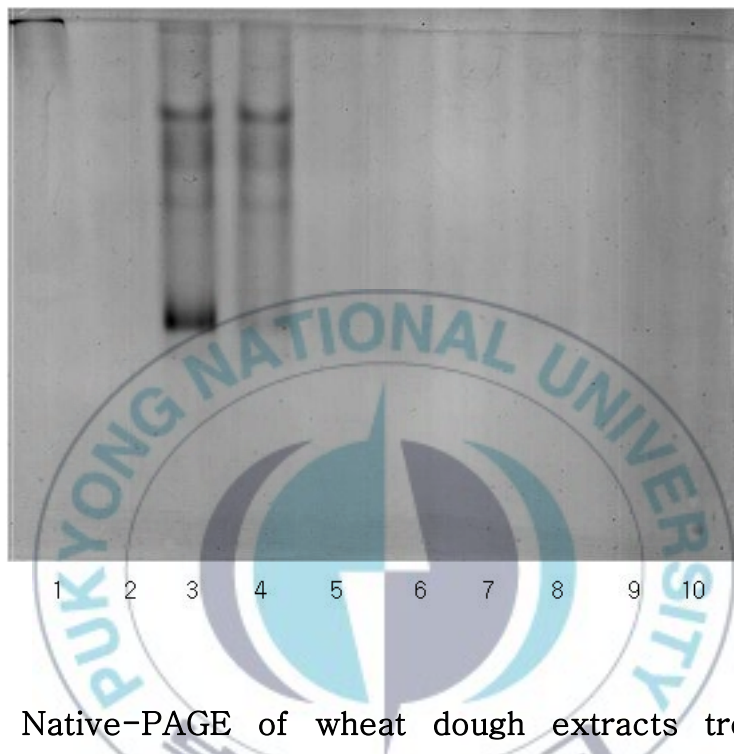


Fig. 25. Native-PAGE of wheat dough extracts treated with supercritical CO₂, autoclave and microwave. Samples are (1) gluten, (2) gliadin, (3) untreated, (4) supercritical CO₂ treated, (5) 10+5 min, (6) 30+5 min, (7) 50+5 min, (8) 10+10 min, (9) 30+10 min, (10) 50+10 min.

요 약

밀 알레르기 억제를 위한 최적의 물리적 처리 조건을 찾기 위하여 초임계 이산화탄소 등 다양한 물리적 처리를 한 후, 밀가루 및 밀반죽 gliadin의 항원성 변화에 대해 알아보기 위해 gliadin의 단백질 및 항원성의 변화를 측정하였다.

1. 초임계 이산화탄소 처리에 의한 변화

밀가루에 200 bar 60℃ 5시간, 250 bar 60℃ 5시간, 250 bar 60℃ 12시간의 조건으로 초임계 이산화탄소 처리를 한 뒤, gliadin에 대한 항원성 변화를 알아보기 위해 Ci-ELISA를 실시하였다. 그 결과, 모든 처리구에서 무처리구와 같이 높은 결합력을 유지하였으며, 처리 압력과 시간에 따른 차이도 보이지 않았다.

2. 초임계 이산화탄소와 감마선 병행 처리에 의한 변화

초임계 이산화탄소 처리한 밀가루와 밀반죽에 대해 감마선 조사(1, 5, 10, 20 kGy)를 병행한 뒤, gliadin 단백질 및 항원성 변화를 측정하였다. 그 결과 모든 처리구에서 gliadin의 항원성 변화를 보이지 않아 감마선 조사가 밀 알레르기 감소에 효과적이지 않음을 알 수 있었다.

3. 초임계 이산화탄소와 초고압 병행 처리에 의한 변화

초임계 이산화탄소 처리한 밀가루와 밀반죽에 대한 초고압 처리의 영향을 알아보기 위해 밀가루에 밀반죽에 100, 300 및 500 MPa의 정수압으로 3분간 초고압 처리하였다. 초고압 처리 후 gliadin의 항원

성 변화를 측정한 결과, 항원-항체 결합력이 무처리구와 비교하여 큰 차이를 보이지 않아 초고압 처리는 gliadin의 항원성 감소에는 효과가 없는 것으로 나타났다.

4. 초임계 이산화탄소와 가압가열 병행 처리에 의한 변화

초임계 이산화탄소 처리한 밀가루와 밀반죽 gliadin의 항원성 변화를 알아보기 위하여 게이지압 1 kg/cm, 121℃에서 5, 10, 30 및 50분간 가압가열 처리한 후 Ci-ELISA를 실시하였다. 그 결과 밀가루의 경우, 가압가열 30분 이상 처리시 항체와의 결합력이 다소 감소하는 경향을 보였고, 특히 50분 처리구에서 약 89%로 가장 낮은 결합력을 보였다. 밀반죽의 경우, 가압가열 30분 처리시 14% 정도로 가장 낮은 결합력을 보였다.

5. 초임계 이산화탄소와 microwave 병행 처리에 의한 변화

Microwave 처리(1, 5 및 10분)에 의해 반죽의 경우 일부 단백질 band의 소실이 관찰되었으나, 밀가루와 반죽 모두 microwave 처리구에서 gliadin과 항체와의 결합력이 높게 유지되어 항원성 감소에는 효과가 없었다.

6. 초임계 이산화탄소, 가압가열 및 microwave 병행 처리에 의한 변화

초임계 이산화탄소 처리한 밀가루 및 밀반죽에 대한 가압가열(10, 30 및 50분)과 microwave(5, 10분)의 영향을 알아본 결과, 밀가루에서 가압가열 50분과 microwave 5분 처리시 항원과 항체와의 결합력이

약 84% 정도로 가장 많이 감소되었다. 반죽의 경우 가압가열 30분, microwave 5분 병행 처리하였을 때, 약 10% 정도의 낮은 결합력을 보여 가압가열과 microwave 병행 처리가 밀반죽 gliadin의 항원성 감소에 효과적임을 알 수 있었다.



참 고 문 헌

Álvarez-Álvarez J., Guillamón, E., Crespo, J. F., Cuadrado, C., Burbano, C., Rodríguez, J., Fernández, C., Muzquiz, M. 2005. Effects of extrusion, boiling, autoclaving, and microwave heating on lupine allergenicity. *J Agric Food Chem* 53(4), 1294-1298.

Battais, F., Mothes, T., Moneret-Vautrin, D. A., Pineau, F., Kanny, G., Popineau, Y., Bodinier, M., Denery-Papini, S. 2005. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* 60(6), 815-821.

Bock, S. A. 1987. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatr* 79(5), 683-688.

Bonomi, F., Iametti, S., Rasmussen, P., Restani, P., Rovere, P. 2000. Advances in the combined application of enzymatic and physical treatments for reducing food allergenicity. *High Pres Res* 19(1), 175-181.

Davis, P. J., Williams, S. C. 1998. Protein modification by thermal processing. *Allergy* 53(46), 102-105.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995. Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies. Rome, Italy, November 13-14.

Grar, H., Kaddouri, H., Gourine, H., Negaoui, H., Kheroua, O., Saidi, D. 2009. Microwave irradiation under different pH conditions induced a decrease in β -lactoglobulin antigenicity. *Eur Food Res Technol* 229(5), 779-783.

Gross, M., Jaenicke, R. 1994. Proteins under pressure - the influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur J Biochem* 221(2), 617-630.

Han, G. D., Fan, J. P., Suzuki, T. 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(5), 594-599.

Han, Y. S., Chung, S. J., Cho, Y. Y., Choi, H. M., Ahn, K. M., Lee, S. I. 2004. Analysis of the rate of sensitization to food allergen in children with atopic dermatitis. *Korean J Community*

Nutr 9(1), 90-97.

Hanane, K., Kamel Eddine, E. M., Omar, K., Djamel, S. 2006. Microwave treatment modify antigenicity properties of bovine milk proteins. *Afr J Biotechnol* 5(13), 1267-1270.

Hefle S. L. 1996. The molecular biology of food allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 16(3), 565-590.

Houska, M., Kminkova, M., Strohalm, J., Setinova, I., Heroldova, M., Novotna, P., Honzova, S., Vavrova, H., Kucera, P., Proskova, A. 2009. Allergenicity of main celery allergen rApi g1 and high-pressure treatment. *High Pres Res* 29(4), 686-694.

Izquierdo, F. J., Penas, E., Baeza, M. L., Gomez, R. 2008. Effects of combined microwave and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *Int Dairy J* 18(9), 918-922.

Kim, D. W., Choe, H. S., Ahn, C. N., Jeong, S. G., Ham, J. S., In, Y. M. 2003. Reduction of antigenicity of bovine casein by microbial enzymes. *J Korean Dairy Technol Sci* 21(2), 97-104.

Kim, M. J., Lee, J. W., Yook, H. S., Lee, S. Y., Kim, M. C., Byun, M. W. 2002. Changes in the antigenic and immunoglobulin E-binding properties of hen's egg albumin with the combination of heat and gamma irradiation treatment. *J Food Prot* 65(7), 1192-1195.

Korea food and drug administration. Labeling standards for foods etc. KFDA notification No. 2011(Amendment on Mar. 31, 2010). Accessed Jan. 1, 2011.

Kumagai, H., Suda, A., Sakurai, H., Kumagai, H., Arai, S., Inomata, N., Ikezawa, Z. 2007. Improvement of digestibility, reduction in allergenicity, and induction of oral tolerance of wheat gliadin by deamidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(4), 977-985.

Kwon, J. H. 1997. Application of irradiation technology in food processing. *Korean J Food Sci Ani Resour* 20(14), 43-54.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(15), 680-685.

Lee, B. O., Chang, O. K., 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(2), 114-124.

Lee, J. W., Byun, M. W. 2003. Food irradiation technology and the structural changes of food allergen by irradiation. *Pediatr Allergy Respir Dis(Korea)* 23(1), 16-23.

Lee, J. W., Park, J. H., Kim, S. B., Kim, C. J., Hyun, C. K., 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(4), 401-410.

Lee, J. W., Yook, H. S., Cho, K. H., Lee, S. Y., Byun, M. W., 2001. The changes of allergenic and antigenic properties of egg white albumin (Gal d 1) by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(3), 500-504.

Lee, S. I. 2006. Food allergy. *Safe food* 1(2). 12-17.

Lee, S. Y., 2004. Food allergy. *Korean J Pediatr* 47(3),

240-246.

Leszczynska, J., Łacka, A., Szemraj, J., Lukamowicz, J., Zegota, H. 2003. The influence of gamma irradiation on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *Eur Food Res Technol* 217(2), 143-147.

Leszczynska, J., Łacka, A., Szemraj, J., Lukamowicz, J., Zegota, H. 2003. The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *Eur Food Res Technol* 217(5), 387-391.

Li, Z., Lin, H., Cao, L., Khalid, J., 2007. The influence of gamma irradiation on the allergenicity of shrimp (*Penaeus vannamei*). *J food engin* 79(3), 945-949.

Maruyama, N., Sugiura, F., Kishimoto, T., Ichise, K., Takeuchi, Y., Sawada, T., Tsuda, A., Utsumi, S. 1999. Decreased IgE-binding with wheat gluten by deamidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 63(3), 567-569.

Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R.M., Wal, J.M., Bernard, H. 2005.

Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *J Agric Food Chem* 53(11), 4547-4553.

Mullin, J. 1995. Microwave processing. In *New Methods of Food Presevation*, Golhd, G.W. (Ed.), *Blackie Acad Prof*, New York. p 112-134.

Park, J. Y., Ahn, J. Y., Hong, H. O., Hahn, Y. S., 2004. Reduction of allergenicity of wheat flour by enzyme hydrolysis. *Korean J Food Sci Technol* 36(1), 152-157.

Restani, P., Ballabio, C., Cattaneo, A., Isoardi, P., Terracciano, L., Fiocchi, A. 2004. Characterization of boivne serum albumin epitopes and their role in allergic reactions. *Allergy* 59(78), 21-24.

Rumbo, M., Chirido, F.G., Fossati, C.A., Anon, M.C. 2001. Analysis of the effects of heat treatment on gliadin immunochemical quantification using a panel of anti-prolamin antibodies. *J Agric Food Chem* 49(12), 5719-5726.

Sampson, H. A. 1999. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103(5), 717-728.

Schofield, J. D., Bottomley, R. C., Timms, M. F., Booth, M. R. 1983. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions. *J Cereal Sci* 1(4), 241-253.

Shibata, M., Saegusa, S., Hosoi, T., Ogawa, T., Numata, K. 2008. The fate of soybean allergens in autoclaved soybeans and 'Edo-ama' miso. *Bull Tokyo Metro Agric Fores Res Cen* 3, 71-79.

Shimada, K., Cheftel, J. C. 1988. Determination of sulphhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. *J Agric Food Chem* 36(1), 147-153.

Shimada, K., Cheftel, J. C. 1989. Sulphydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. *J Agric Food Chem* 37(1), 161-168.

Shin, J. H., Jeong, S. G., Han, G. S., Jang, A., Chae, H. S., Yoo, Y. M., Ahn, C. N., Lee, J. W., Jo, C., Lee, W. K., Ham, J. S. 2008. Reduction of the antigenicity of powdered milk by gamma irradiation. *Korean J Food Sci Ani Resour* 28(3), 306-311.

Shon, D. W. 2000. Food and allergy. *Food Sci Indus* 33(4), 2-9.

Son, D. Y., Yoon, K. R., Lee, S. I. 2002. Study of the most common allergic foods in Korea. *Korean J Food Sci Technol* 34(5), 885-888.

Son, K. H. 1997. 식품분야에서의 고압기술의 이용. *Korean J Food Sci Ani Resour* 20(14), 105-118.

Steinrauf, L. K., Dandliker, W. B. 1958. A study of the reaction of the disulfide groups of bovine serum albumin during heat denaturation. *J Am Chem Soc* 80(15), 3833-3835.

Tanabe, S., Kobayashi, Y., Takahata, Y., Morimatsu, F., Shibata, R., Nishimura, T. 2002. Some human B cell and T cell epitopes of bovine serum albumin, the major beef allergen. *Biochem Biophys Res Commun* 293(5), 1348-1353.

Towbin, H. T., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9), 4350-4354.

Varjonen, E., Björkstén, F., Savolainen, J. 1996. Stability of cereal allergens. *Clin Exp Allergy* 26(4), 436-443.

Venkatachalam, M., Teuber, S. S., Roux, K. H., Sathe, S. K. 2002. Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins. *J Agric Food Chem* 50(12), 3544-3548.

Waga, J., Zientarski, J., Obtulowicz K., Bilo, B., Stachowicz, M. 2008. Gliadin immunoreactivity and dough rheological properties of winter wheat genotypes modified by thioredoxin. *Cereal Chem* 85(4), 488-494.

Winters, M. A., Knutson, B. L., Debenedetti, P. G., Sparks, H. G., Przybycien, T. M. 1996. Precipitation of proteins in supercritical carbon dioxide. *J Pharm Sci* 85(6), 586-594.

Xu, D., Yuan, F., Jiang, J., Wang, X., Hou, Z., Gao, Y. 2011. Structural and conformational modification of whey proteins induced by supercritical carbon dioxide. *Innov Food Sci Emerg Tech* 12(1), 32-37.

Yamamoto, S., Takanohashi, K., Hara, T., Odani, S., Suzuki, A., Nishiumi, T. 2010. Effects of a high-pressure treatment on the wheat alpha-amylase inhibitor and its relationship to elimination of allergenicity. *J phys* 215(1), 1-4.



감사의 글

배움의 길은 참 먼 것 같습니다. 아직도 다 갖추지 못한 저에게 2년이라는 석사과정은 참 짧게만 느껴졌는데, 이렇게 석사 과정을 마무리하게 된 시점에서 많은 아쉬움과 후회가 남습니다. 하지만 포기는 할 수 없다는 굳은 마음으로 논문을 완성할 수 있었고, 이 논문이 나오기까지 크고 작은 도움을 주신 분들께 감사의 말을 전하고자 합니다.

먼저 정말 많이 부족한 저에게 학업적인 면뿐만 아니라 인생을 사는 법까지 많은 깨달음을 주신 안동현 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 부족한 제 논문을 심사해주신 조영제 교수님과 전병수 교수님을 아울러 그동안 많은 가르침을 주신 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 이양봉 교수님, 김영목 교수님께도 깊은 감사의 말을 드립니다.

저에겐 식품자원개발실 식구들이 있었기에 좋은 결실을 맺을 수 있었습니다. 먼저 부족한 후배에게 하나부터 열까지 많은 도움을 준 꽃봉 언니 덕분에 무사히 잘 마무리 할 수 있었던 것 같습니다. 또한 본보기의 대상이었던 이소언니, 유진언니, 처음 실험실에 들어와 아무것도 모르는 저를 열정터지게 가르쳐주었던 서진이언니와 윤소언니, 소정이언니에게도 감사의 말을 전합니다. 선배로서 친구로서 없어선 안 될 존재였던 청조, 같이 많은 것을 나누었던 지연 너희가 있어 여기까지 올 수 있었고, 나의 고민을 잘 들어주던 고마운 민지언니, 항상 믿음직스런 금동선배, 심심하지 않게 해준 편한 친구인 찬이, 애교덩어리 슬아, 똑똑이 주연, 말라깽이 현지, 엄퀴터 준호, 만능재주꾼 다현, 귀염뎡이 민정, 이제 막 새로운 시작을 한 미라, 예의바른 준영, 카요미

가영, 흰둥이 원민이에게도 고맙다는 말을 전하며, 언젠간 모두 각자의 위치에서 빛날 것이라 얘기하고 싶습니다.

또한 대학생활을 함께 했던 소중한 독수리 오자매 힘들다하면서도 꿈을 위해 박사과정 밟고 있는 멋진 유리, 엉뚱한 매력 행님이고픈 부행님 유나, 항상 우리에게 큰 웃음을 주었던 매력덩어리 은진, 막내주제에 제일 먼저 품절녀가 될 지영이에게도 고마우며, 나의 베스트 다이스키 은정, 현경이와 동맥의 힘 삼은이, 진규오빠, 동범이오빠에게도 고마운 마음을 전합니다. 무엇보다도 힘들 때마다 항상 옆에서 큰 힘이 되어준 대웅이오빠에게 기다려줘서 정말 고맙다는 말을 꼭 전하고 싶습니다. 덕분에 버틸 수 있었습니다.

마지막으로 맨날 툅툅거리는 딸 힘들다고 안쓰럽다고 그저 묵묵히 뒤에서 뒷바라지 하시느라 고생하신 사랑하는 우리 엄마, 아빠 그리고 항상 열심히 응원해준 언니와 형부에게도 진심으로 감사드리며, 꼭 보답하겠다는 말을 전하고 싶습니다.

쉽지만은 않았던 지난 시간과 경험들을 발판 삼아 앞으로 더욱 발전하고 변화되어 좋은 영향을 미치는 사람이 되도록 노력하겠습니다.