식품 알레르겐 분석법 연구 동향 – LC-MS를 중심으로

Research Trend of Food Allergen Analysis Method - Focusing on LC-MS Method

이채윤[1], 박지용[2], 오상석[1*]

Chaeyoon Lee[1], Zee-Yong Park[2], Sangsuk Oh[1*]

[1]이화여자대학교 식품공학과, [2]광주과학기술원 생명과학부

[1]Dept. of Food Science and Engineering, Ewha Womans University, Republic of Korea;
[2]Dept. of Life Sciences, Gwangju Institute of Science and Technology, Republic of Korea

Ⅰ. 서론

식품알레르기는 세계보건기구(WHO)에서 '전 세계에서 가장 중요한 공중 보건 문제' 중 하나로 발표하였다(1). 특정한 식품에 민감한 반응을 보이는 식품알레르기의 증상은 가벼운 피부증상이나 소화 장애부터 아나필락시스와 같이 생명을 위협하는 상황을 초래할 수 있는 심각한 증상까지 다양하며 이러한 식품알레르기를 예방할 수 있는 유일한 대안은 해당 식품을 철저히 제외한 식단을 유지하는 것이기 때문에 이로 인한 영양 불균형 및 스트레스로 인해 삶의 질이 저하될 우려가 있다(2).

소비자에게 안전한 식품 정보를 제공하고 식품 알레르기로 고통 받는 소비자를 보호하기 위해 미국, 유럽, 일본 등 여러 국가에서는 식품 중 특정 알레르기 유발물질(알레르겐)이 존재한다는 것을 식품에 표시하도록 하는 법을 적용하고 있으나 식품 가공과정이나 저장 중 교차오염으로 인해 원료 또는 최종 제품에 비의도적으로 알레르겐이 포함될 가능성이 있다. 따라서 식품에 의도적으로 원료로 사용된 알레르겐 및 비의도적으로 포함된 알레르겐을 정확히 표시하고 확인하는 것이 중요하며, 또한 신뢰할 수 있고 정확한 식품 알레르겐 분석 방법이 필요하다(3).

식품 알레르기는 개인의 건강에 영향을 줄 뿐만 아니라 산업체에는 회수조치로 인한 경제적, 대외적 타격을 가져올 수 있다. 최근 미국 FDA 회수대상의 40%가 식품 알레르겐이 원인이며, 미국 FDA에서는 식품알레르기 관련 법규 위반으로 인해 매년 약 150건에 이르는 회수조치가 시행되고 있다. 이로 인한 사회적 · 경제적 손실을 예방하기 위해 정확한 알레르겐의 분석 방법의 개발이 진행되고 있다(4).

식품 알레르겐을 분석하는 방법은 크게 DNA를 기반으로 하는 방법인 Polymerase chain reaction(PCR)과 항원항체반응을 이용한 면역학적 방법을 기반으로 하는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), 그리고 단백질 펩타이드를 직접 분석하는 Liquid

* Correspondence to: Sangsuk Oh
Dept. of Food Science and Engineering, Ewha Womans University, 52, Ewhayeodae-gil, Seodaemun-gu, Seoul 03760 Republic of Korea
Tel: 82-2-3277-2751 E-mail: ssoh71@ewha.ac.kr

chromatography-Mass spectrometry(LC-MS)가 있으며, PCR과 ELISA는 식품 알레르겐 분석법으로 가장 널리 이 이용되고 있다. 그러나 PCR 방법의 경우 DNA를 검출하는 간접적인 방법이며 ELISA 또한 위음성 및 위양성 결과의 단점이 있으며, 2000년 이후 활발한 연구가 진행되고 있는 LC-MS 분석법은 알레르겐을 직접 검출함과 동시에 정확성이 높은 분석법으로서 PCR과 ELISA의 단점을 보완할 수 있는 방법으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 이에 본고에서는 식품알레르겐 표시제도와 미표시 알레르겐을 간략히 기술하고, LC-MS 분석법을 중심으로 최신 연구동향을 소개하고자 한다.

II. 본론

식품알레르겐 표시제도 및 미표시 알레르겐

식품알레르기는 소비자의 건강을 해할 우려가 있기 때문에 미국, 유럽 등 선진국을 포함한 여러 나라에서는 각 나라의 '주요 식품알레르기 유발물질'을 제품에 표시하도록 하는 법을 제정하고 있다. 미국은 'Big 8 allergens'으로써 식품알레르기 유발성분 표시 및 소비자 보호법 2004 (Food Allergen Labeling & Consumer Protection Act)에 따라 우유, 달걀, 생선, 갑각류, 견과류, 밀, 땅콩, 대두 등 8가지 식품에 대해 알레르기 유발성 표시를 하도록 하고 있으며(5), 유럽연합은 샐러리, 겨자, 루핀, 연체동물을 포함한 14개 알레르기 유발식품을 규정하고 있다(6). 일본은 표시 의무 품목 7가지와 표시 권장 품목 20가지로 나누어 관리하고 있으며, 의무품목에는 새우, 게, 밀, 메밀, 알류, 우유, 땅콩을 포함하고 있다(7). 우리나라 「식품등의 표시기준」에 의하면 난류, 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토, 아황산류, 호두, 닭고기, 쇠고기, 오징어, 조개류(굴, 전복, 홍합 포함)등 18 품목을 사용한 경우 이를 표시하도록 하고 있다(8). 식품의약품안전처에서 올해 9월 공고한 일부개정고시(안) 행정예고에는 소아에게 중증 알레르기 반응을 유발할 수 있는 '잣'을 알레르기 유발물질 의무표시 대상에 추가하는 규정이 포함되어있다.

이처럼, 각 나라마다 식문화가 다르기 때문에 알레르기 유발물질 표시 제도에 포함된 식품은 각 나라마다 차이가 있다. 특히, 한국과 일본은 서구에서는 잘 섭취하지 않는 '메밀'을 국수, 전, 소바, 차 등의 다양한 형태로 섭취하고 있기 때문에 표시대상에 포함되어 있다. 식품 알레르겐 분석법 개발은 주로 미국, 유럽 등 선진국에서 진행되고 있기 때문에, 연구 대상 또한 밀, 우유, 계란, 대두, 견과류 등에 집중되어 있어 한국의 주요 알레르기 유발식품의 분석 연구가 식품의약품안전처를 중심으로 진행되고 있다.

미표시 알레르겐은 해당 식품에 표기되지 않은 알레르기 유발 원료를 말하는 것으로, 이로 인해 알레르기 환자가 확인을 하지 못한 채 섭취하게 되어 식품안전사고를 일으킬 수 있어 철저한 관리가 필요하다. 미표시 알레르겐은 식품 제조 과정 중 원료의 오염, 표시제도의 허점, 오해의 소지가 있는 표기 등에 의해 식품 중에 존재할 수 있으며, 식품 제조에 사용된 기구 및 시설에서 그 제품에 사용하지 않은 알레르기성이 있는 다른 원료가 오염됨으로써 미표시 알레르겐으로서 존재하는 경우가 있다. 이를 방지하기 위해 식품 제조회사들은 자발적으로 주의환기 문구를 포장에 표기하고 있으나, 이를 표시하지 않은 제품에서도 미표시 알레르겐이 존재할 수 있기 때문에 알레르기 환자들은 철저한 식품안전을 보장받기 어려운 실정이다. 일반적으로 알레르겐을 확인하는 방법으로써 상대적으로 분석법이 용이한 상업적 ELISA kit를 이용한 분석법이 많이 이용되고 있다.

식품알레르겐 분석법-PCR, 면역학적 분석법

식품 알레르기는 미표시 알레르겐으로 인한 위험이 있기 때문에, 식품 알레르겐을 분석할 수 있는 신뢰도가 높고 감도 높은 방법의 개발이 요구되고 있다. 식품 알레르겐 분석법으로써 PCR, 면역학적 분석법, LC-MS 방법이 있다. PCR 분석법은 알레르기 유발식품의 특정 염기쌍 서열을 갖는 DNA의 검출에 기초하는 특이적인 분석 방법이다. 그러나 DNA의 질과 양에 따라 민감도가 영향을 받

으며, DNA는 식품 매트릭스 성분 및 가공처리에 민감하기 때문에 위음성 결과가 도출될 수 있다(9). 또한 PCR 분석법은 일부 식품에서 조직 단백질과 부산물의 DNA를 구별(예: 쇠고기와 우유, 닭고기와 계란)하기 힘든 단점을 가지고 있기 때문에 가공식품에서 계란이나 우유 알레르겐 분석에 거의 사용되지 않는다(10).

현재까지 식품 알레르겐 분석을 위하여 가장 많이 이용하는 방법은 항원-항체 반응을 이용하는 면역학적 분석법이다. 면역학적 분석법은 분석 방법이 비교적 간단하고 분석 소요 시간이 짧다는 장점이 있다. 그러나 상업적 kit를 판매하는 회사의 제품마다 재현성이 다르며, 구조가 비슷한 타 알레르겐과 교차반응 가능성이 있고, 가공 공정 중 가열처리가 민감도 또는 검출 특이성에 영향을 미칠 수 있다는 단점이 있다(11). 미국 FDA는 주요 식품 알레르겐 분석 방법으로, 상업적으로 이용 가능한 면역 kit를 식품 알레르겐 분석법으로 권고하고 있다. 현재 땅콩, 우유, 밀, 계란, 견과류, 대두, 갑각류 등 7개 알레르기 유발 식품 분석에 주로 이용하고 있는 Neogen, R-Biopharm, Elisa Systems를 포함한 7개 회사의 52개 상업적 kit의 사용을 권고하고 있으며, 이들에 대한 검증과 각각의 검출한계 및 정량한계를 제시하고 있다(12). 상업적 면역 kit는 분석 과정이 비교적 간단하고 흡광도 측정기가 있으면 결과를 쉽게 판독할 수 있어 정부 및 기업에서 가장 널리 이용되고 있는 식품 알레르겐 분석 방법이다. 그러나 하나의 알레르겐 유발식품을 대상으로 하더라도 각 kit마다 분석 대상이 되는 단백질의 종류가 다양하며 검출한계와 교차반응성 등이 달라 가공식품 중 미표시 알레르겐 분석 시 도출된 결과가 상충하는 경우도 있다.

식품알레르겐 분석법-LC-MS

최근 주목받고 있는 LC-MS 분석법은 분자량에 관한 정보를 바탕으로 아미노산 조각 이온과 펩타이드의 아미노산 서열의 매칭을 이용하여 데이터베이스 검색 알고리즘을 통해 단백질을 동정할 수 있는 방법으로서, 특정 펩타이드를 직접 분석하기 때문에 기존의 PCR, ELISA보다 정확성이 높다는 장점을 가지고 있다(13). LC-MS를 이용한 분석 방법의 간략한 설명은 다음과 같다. 트립신 등 효소로 가수분해 된 단백질 시료는 HPLC 등의 크로마토그래피에 의해서 분리된 후 질량분석기에 주입되거나, 직접 주입된 시료가 electrospray ionization (ESI) 장치를 통해서 질량 분석기 내부로 이동하게 된다. 이온화 장치(ionization source), 분석관(analyzer), 검출기(detector) 등으로 구성된 질량 분석기의 내부는 고진공 상태에서 작동되며, 이온화 장치에서 형성된 시료 이온들은 원하는 질량들만 선택적으로 통과시키는 분석관을 통과한 후 검출기에 도달하고, 선택하지 않은 이온들은 검출기에 도달하기 전에 제거 된다. 검출기에 도달된 이온들은 신호가 증폭되어 컴퓨터의 자료 처리 장치에 우리가 흔히 볼 수 있는 질량 대 전하비(m/z)에 따라서 분리된 질량 스펙트럼을 얻게 되고 이를 바탕으로 질량 분석에 앞서 분리 분석 장비가 연결된 GC/MS 또는 LC-MS에서는 크로마토그램을 얻게 된다. 알레르겐 단백질 분석에 주로 사용되는 LC-MS를 이용한 검출법은 분자 질량 특성을 사용하여 검출되는 알레르기 단백질에서 유래된 펩타이드 들을 직접 분석하기 때문에 정확도가 높으며, 각 펩타이드들의 질량 분석을 통해 얻어진 정량적인 정보는 해당 단백질의 시료내 존재양과 일치하기 때문에, 알레르겐 단백질의 정량 정보를 확실하게 얻을 수 있으며, 정확한 분자량을 토대로 한 LC-MS 방법은 ELISA와 PCR의 한계점인 양성오류(false positive)와 위음성(false negative) 결과를 최소화할 수 있다(3).

단백질 시료의 분석은 일반적으로 단백질 또는 펩타이드 수준에서 여러 분리 단계를 거친 후, 질량 분석(MS)으로 이루어진다. 프로테오믹스(proteomics) 접근법으로는 일반적으로 Bottom-up proteomics와 Top-down proteomics의 두 가지 방법이 있다. Bottom-up 접근법은 단백질 시료를 트립신과 같은 효소로 가수분해한 후 펩타이드 조각을 질량분석기로 분석하는 방법이며, 펩타이드 기반 프로테오믹스라고도 하며, Top-down 접근법은 전체 단백질을 질량분석기 내부에서 조각내어, 단백질 가

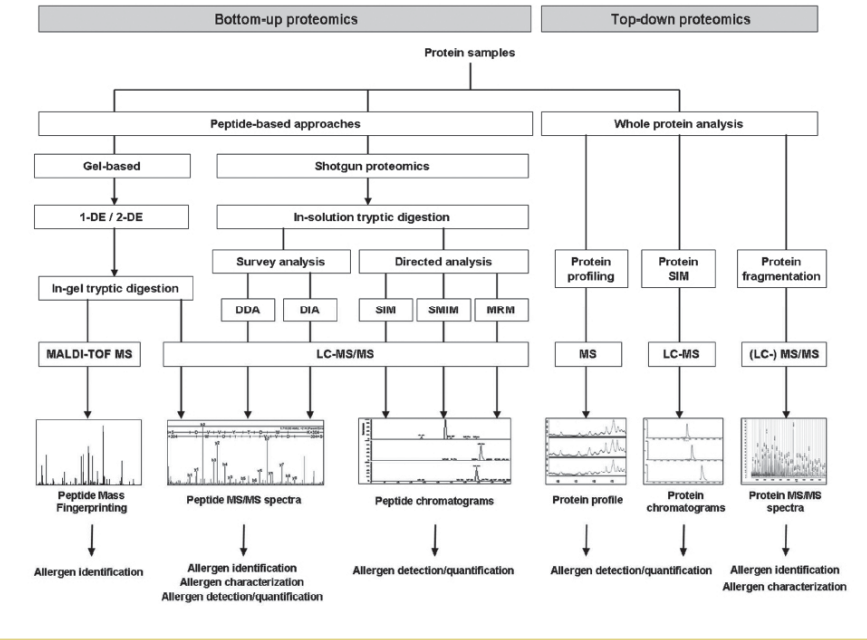

그림 1. 식품 알레르겐 특성화 및 정량분석을 위한 프로테오믹스 접근법(3)

수분해 단계를 피하는 방법이다(14). 두 가지 방법 모두에서, 단백질 및 펩타이드는 질량분석 데이터와 단백질 데이터베이스로부터 유도 된 이론적 질량 값을 비교하여 확인한다(15). 두 접근법 중 Bottom-up 방식이 주로 이용되며, 이 방식은 다시 전기 영동 기반 및 샷건(shotgun) 프로테오믹스 접근법으로 나눌 수 있다. 전기 영동 기반 접근법의 방식은 단백질 시료를 2 차원 전기영동으로 분리한 후 분리된 단백질이 포함된 부분의 젤을 취하여 효소를 이용하여 내부에서 가수분해한 후 가수 분해된 펩타이드들을 질량분석기로 분석한다. 전기영동을 이용한 단백질 분리는 액체크로마토그래피를 이용한 단백질 분리와 비교할 때 몇 가지 단점이 있다. 단백질의 농도가 낮거나 매우 산성 혹은 염기성일 경우 분석에 제한이 있을 수 있다. 반면에 광범위하게 사용되고 있는 샷건 프로테오믹스 방식은 시료 내의 모든 단백질을 효소로 가수분해 하기 때문에 가수분해한 시료는 LC-MS로 분석하는데, 이 때 펩타이드는 질량분석기 내부에서 직접 분석하거나 펩타이드가 분해된 분해 이온들을 분석함으로서 MS 또는 MS/MS 데이터를 얻을 수 있다. 분석 데이터는 다양한 단백질 데이터베이스 검색을 통해 확인할 수 있다. 그림 1은 식품 알레르겐 연구에 사용되고 있는 프로테오믹스 접근법들을 요약 한 것이다. 서로 다른 시료 또는 조건 사이의 상대적 또는 절대적 단백질 농도와 같은 단백질 수준의 정량적 정보는 프로테오믹스 접근법을 이용하여 MS 또는 MS/MS 분석결과로부터 얻을 수 있다(3). 분석된 펩타이드가 알레르겐 단백질에 포함된 것인지를 판단할 때에는 주요 알레르기 유발식품의 각 알레르겐 정보를 제공하고 있는 WHO/IUIS Allergen Nomenclature, FARRP Allergen Protein Database, Allermatch, Structural Database of Allergenic Proteins 등의 데이터베이스를 통해 확인 가능하다.

질량분석기기(mass spectrometer)는 질량 분석 방식에 따라 Quadrupole Analyzer, Quadrupole-Ion trap, Time of Flight Mass Spectrometer 등 다양한 종류가 있으며, 최근에는 orbitrap을 적용한 고정확성 고분해능 질량분석기기 들이 이용되고 있다. Quadrupole-Ion trap은 Tandem-in-time MS인 ion trap의 검출한계가 Tandem-in-space MS인 triple quadrupole에 비해 높기 때문에 data dependent acquisition 분석에 적합하며 대표적인 분석 기기로는 LTQ Ion Trap Mass Spectrometer가 있다. 비교적 최근에 개발 된Quadrupole-orbitrap 형태의 질량 분석기는 첨단 사중 극자 기술을 적용하여 펩타이드 이온들을 높은 효율로 분리할 수 있으며 기존의 multiple reaction monitoring(MRM)을 이용한 정량 분석 보다 월등한 parallel reaction monitoring(PRM) 정량 분석이 가능

하며 복잡한 시료를 분석하는데 적합하다. 대표적인 분석 기기로는 Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer가 있다.

LC-MS 분석방법에는 데이터-의존적 수집(Data-dependent acquisition, 선택 반응 모니터링(Selected reaction monitoring), 병렬 반응 모니터링(Parallel reaction monitoring), 선택 이온 검출법(Selected ion monitoring)이 있다. 질량분석에 일반적으로 사용되는 데이터-의존적 수집 방법은 풀 스캔 질량 스펙트럼에서 이온화된 펩타이드에 대한 질량 정보를 사용하여 서열 식별에 필요한 텐덤 메스 스펙트럼의 대상이 될 펩타이드들을 자동적으로 결정하고 분석하는 방법이다(16). 이 방법은 복잡한 시료 내에서 분석에 적합한 펩타이드들을 효율적으로 찾아내고 분석할 수 있다는 장점이 있다. 선택 반응 모니터링 방법은 선택된 펩타이드들만을 기체 상태에서 분해 반응을 일으키는 MS/MS 방법으로서 펩타이드의 질량값과 분해 반응을 통해 발생되는 펩타이드 분해 이온들의 질량값을 이용하는 두가지 필터링을 통해 분석 과정에서 신호 대 잡음비(Signal-to-noise ratio, S/N)를 증가시킬 수 있기 때문에 미량의 시료 정량 분석 시 가장 많이 사용되고 있는 방법이다. 병렬 반응 모니터링 방법은 quadrupole-Orbitrap과 같은 고해상도 하이브리드 질량분석기술을 사용하여 수행되는 정량화 방법으로 펩타이드 분해 이온들 전체를 대상으로 정량분석이 진행되기 때문에 신뢰성이 높은 정량 분석 결과를 얻을 수 있다는 특성이 있다. 마지막으로 선택 이온 검출법은 마찬가지로 정량 분석에 적합한 기술인데 단백질에서 유래된 전체 펩타이드들을 분석하는 것이 아니라 선택된 펩타이드들의 질량값 만을 지정하여 이들의 정확한 질량값 (- ppm 수준)을 이용하여 정량 분석을 진행하게 되는데 낮은 수준의 pico gram 에서 femto gram의 양 까지도 측정 가능한 방법이다(17, 18).

LC-MS를 이용한 식품 알레르겐 분석을 위해서는 단백질 시료의 효소 가수분해 과정이 요구된다. 분석하고자 하는 단백질 시료는 BCA assay, Bradford assay 등의 방법을 이용하여 농도를 측정하고, dithiothreitol과 iodoacetamide를 첨가하여 이황화 결합 (disulfide bond)을 이루고 있는 cysteine 잔기들의 환원 및 알킬레이션(alkylation) 반응을 유도하여 단백질의 4차구조를 제거한다. 트립신 효소를 첨가하여 가수분해 후 Sep-Pak C18 카트리지 등을 이용하여 염과 트립신 효소를 제거하면 분석 시료가 준비된다(그림 2). 시료를 LC-MS 분석하여 얻은 펩타이드 동정 데이터는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 Blast(Basic Local Alignment Search Tool)을 이용하여 알레르겐 단백질에 대한 해당 펩타이드의 특이성을 확인할 수 있다. 특이성이 확인된 펩타이드는 피크의 신호 대 잡음비, 머무름 시간(LC retention time), 펩타이드-스펙트럼 일치(peptide-spectrum matches) 정도를 비교하여 알레르겐 단백질을 대표할 수 있는 마커(marker) 펩타이드로서의 이용 가능성을 확인할 수 있다(그림 3).

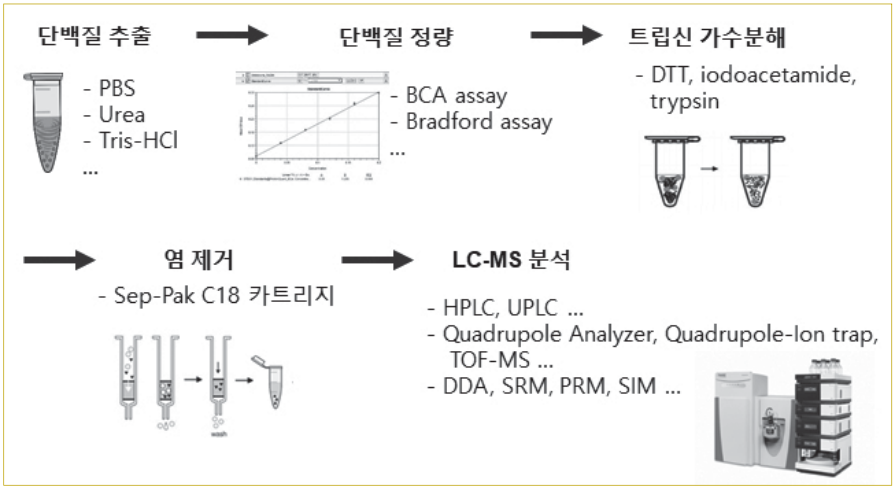

그림 2. 식품 알레르겐 LC-MS 분석 시료 준비 과정

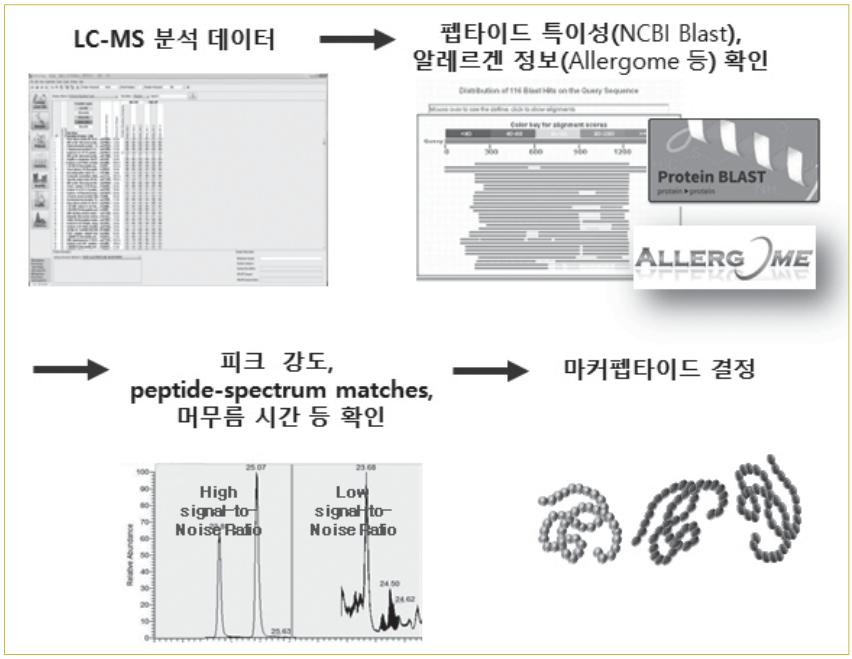

그림 3. 식품 알레르겐 마커펩타이드 결정을 위한 LC-MS 분석

식품알레르겐 분석법-LC-MS 연구 동향

LC-MS 분석법은 식품 단백질의 특이적인 펩타이드를 직접 검출하는 방법으로서 정확도가 높고 확정 검출이 가능하다는 장점이 있어 미국, 유럽 등 선진국을 중심으로 세계 각국에서 LC-MS에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 발표된 LC-MS 식품 알레르겐 분석 연구는 주로 서양의 주요 알레르겐인 우유, 땅콩, 계란, 대두, 밀, 갑각류, 견과류 등을 대상으로 하고 있다. 식품의약품안전처「식품등의표시기준」현행법에 포함되어있는 메밀, 닭고기, 돼지고기, 복숭아, 토마토, 쇠고기, 오징어, 조개류에 대한 LC-MS 분석법의 연구는 아직 보고된바 없어, 한국을 포함한 동아시아 국가의 주요 알레르기 유발식품의 LC-MS 분석법을 위한 연구의 필요성이 있다.

최근 식품알레르겐 LC-MS 분석법은 우유, 계란, 대두 등 주요 알레르겐을 대상으로 한 것이 다수이며, 여러 알레르겐을 동시에 분석하는 동시다중분석법 연구도 진행되고 있다. 최근 보고된 주요 알레르기 유발식품의 마커펩타이드 염기서열과 해당 단백질 정보를 표 1에 정리하였다. 본고에서는 전 세계적으로 공통적인 주요 알레르겐이며 최근까지도 활발한 연구가 진행되고 있는 우유를 대상으로 한 연구들을 간략히 소개하고자 한다. Monaci 등(2010)은 백포도주에 식품제조용 재로 사용되는 우유 단백질을 분석하여 α-casein과 β-casein에 해당하는 4가지 펩타이드를 마커펩타이드 후보로 선정하였고(19), 같은 해 우유 파우더를 첨가하여 만든 쿠키에서 α-S1 casein에 해당하는 펩타이드 2종이 가장 많이 검출되는 것을 확인하고 열처리된 식품 분석에 이용 가능한 마커펩타이드로서의 가능성을 제시하였다(20). 또 다른 우유 단백질을 분석하기 위한 연구로써 Ansari 등(2011)은 BLAST 분석을 통해 7개 마커펩타이드를 선정하였는데, 이 중 젖소의 유(乳)에 특이적인 펩타이드는 LIVTQTMK 1개뿐 이었으며 2개는 버팔로의 유(乳)에도 존재하는 펩타이드이며, 나머지 4개 펩타이드 또한 염소, 야크 등 다양한 종류의 반추동물의 유(乳)에 동시에 존재하는 펩타이드이다(21). 이는 반추동물의 유단백질 구성이 서로 비슷하기 때문에 젖소의 유(乳)에만 특이적이면서 LC-MS/MS 분석 조건에 적합한 펩타이드를 찾는 것이 쉽지 않기 때문인 것으로 판단된다.

단백질은 열에 의해 변성될 수 있기에 가열 조건에서 펩타이드를 분석하는 연구 또한 꾸준히 보고되고 있다. 미국 FDA의 연구에서 일정 농도의 우유를 쿠키 반죽에 첨가하여 180℃에서 16분간 구운 쿠키에서 αS1-casein에 해당하는 3가지 펩타이드를 분석하였으며, ELISA 방법과 비교하였을 때 2.5배 높은 검출수준을 보이는 것을 확인하였다(22). Chen 등(2015)은 β-casein 용액을 첨가한 반죽을 오븐에서 170℃에서 25분간 가열하여 분석하여 가열처리에 안정적인 펩타이드를 정량한계 500㎍/kg까지 분석하였다(10).

표 1. 주요 식품알레르겐의 마커펩타이드

식품	분석 알레르겐	마커펩타이드 염기서열		참고문헌
우유	αS1−casein	YLGYLEQLLR	FFVAPFPEVFGK	(26)
	α−lactalbumin ß −lactoglobulin α−casein ß −casein	VGINYWLAHK IPAVFK LIVTQTMK	YLGYLEQLLR FFVAPFPEVFGK GPFPIIV VLPVPQK	(21)
	Casein aS1 Casein aS2	YLGYLEQLLR	NAVPITPTLNR	(23)
	αS1−casein ß −lactoglobulin	YLGYLEQLLR FFVAPFPLEVFGK	TPEVDDEALEK	(27)
	αS2−casein ß −casein κ−casein	YIPIQYVLSR		(28)
	αS1−casein	FFVAPFPEVFGK	YLGYLEQLLR	(29)
	ß −lactoglobulin α−lactalbumin αS1−casein	TPEVDDEALEK VGINYWLAHK	YLGYLEQLLR	(30)
	αS1−casein	YLGYLEQLLR	FFVAPFPEVFGK	(24)
	αS1−casein ß −casein	YLGYLEQLLR FFVAPFPEVFGK	EPMIGVNQELAYFYPELFR DMPIQAFLLYQEPVLGPVR	(31)
	αS1−casein ß −casein κ−casein ß −lactoglobulin	HQGLPQEVLNENLLR EPMIGVNQELAYFYPELFR YLGYLEQLLR FFVAPFPEVFGK DMPIQAFLLYQEPVLGPVR	SPAQILQWQVLSNTVPAK VYVEELKPTPEGDLEILLQK VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAP−LR LSFNPTQLEEQCHI	(25)
계란	Ovalbumin	HIATNAVLFFGR YPILPEYLQCV	DILNQITKPNDVYSFSLASR ELINSWVESQTNGIIR	(23)
	Ovalbumin	ISQAVHAAHAEINEAGR	EDTQAMPFRV	(32)
	Ovalbumin	EVVGSAEAGVDAASVSEEFR GGLEPINFQTAADQAR	LTEWTSSNVMEER YPILPEYLQCVK	(27)
	Ovalbumin	GGLEPINFQTAADQAR		(29)
	Ovalbumin	GGLEPINFQTAADQAR	YPILPEYLQCVK	(24)
	Lysozyme Ovalbumin	NTDGSTDYGILQINSR AFKDEDTQAMPFR	LTEWTSSNVMEER GGLEPINFQTAADQAR	(31)
	Ovotransferrin Lysozyme C Ovomucoid	FYTVISSLK SAGWNIPIGTLLHR FFSASCVPGATIEQK TDERPASYFAVAVAR GAIEWEGIESGSVEQAVAK	ECNLAEVPTHAVVVRPEK GTDVQAWIR FESNFNTQATNR NTDGSTDYGILQINSR TCNPSDILQMCSFLEGK	(25)
밀	Gluten	AEDKDVCKNY CDEF	ECADDRADL	(33)
	Prolamin	IALPVPSQPVDPR	FIALPVPSQPVDPR	(34)
	Gluten	LQPQNPSQQQPQEQVPL TQQPQQPFPQQPQQPFPQ	VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL	(35)
	α−amylase trypsin inhibitor	YFIALPVPSQPVDPR		(28)

식품	분석 알레르겐	마커펩타이드 염기서열		참고문헌
대두	Glycinin	VFDGELQEGR		(23)
	ß -Conglycinin	ESYFVDAQPK	TISSEDKPFNLR	(27)
	Glycinin G1 Glycinin G2 ß -Conglycinin	HNIGQTSSPDIYNPQAGSVTTATSLDFPALSWLG TNDRPSIGNLAGANSLLNALPEEVIQHTFNLK DLDIFLSIVDMNEGALLLPHFNSK		(28)
	Glycinin G1	SQSDNFEYVSFK	FYLAGNQEQEFLK	(29)
	Glycinin G1-G2	SQSDNFEYVSFK	FYLAGNQEQEFLK	(24)
	Glycinin G1-G4 ß -Conglycinin	LSAEFGSLR 외 42개		(25)
땅콩	Ara h 1 Ara h 3/4	DLAFPGSGEQVEK GTGNLELVAVR	RPFYSNAPQEIFIQQGR WLGLSAEYGNLYR	(23)
	Ara h 1 Ara h 2 Ara h 3	CCNELNEFENNQR CMCEALQQIMENQSDR AHYQVVDSNGDR	SPDIYNPQAGSLK AQSENYEYLAFK	(36)
	Conarachin	VLLEENAGGEQEER	GTGNLELVAVR	(29)
	Conarachin	VLLEENAGGEQEER	EGEQEWGTPGSEVR	(24)

최근 여러 가지 알레르겐을 동시에 검출하는 동시다중 분석법 관련 연구 논문들이 발표되고 있다. 7가지 알레르겐을 동시 분석한 연구논문에서는 우유, 계란, 대두, 헤이즐넛, 땅콩, 호두, 아몬드를 가루형태로 밀가루에 일정 농도 첨가하여 200℃에서 60분간 구운 빵을 분석하였으며, 검출한계는 우유, 헤이즐넛, 땅콩, 아몬드의 경우 약 10㎍/g, 계란과 대두의 경우 50㎍/g 미만, 호두의 경우 70㎍/g임을 확인하였다(23). Pilolli 등(2017)은 계란, 우유, 대두, 헤이즐넛, 땅콩을 첨가하여 만든 쿠키에서 각 알레르겐의 마커펩타이드에 따라 정량한계 19~40㎍/g, 검출한계 6~13㎍/g를 보고하였다(24). 2018년 발표된 연구로 칠면조 소시지, 훈제 닭 가슴살 등 다양한 가금육 제품에서 대두 펩타이드 43개, 우유 펩타이드 9개, 계란 펩타이드 12개 등 다수의 열안정성 펩타이드를 보고하였다(25). 동시다중분석법은 여러 종류의 알레르겐에 해당하는 마커펩타이드들을 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있으나 아직까지는 단일 식품 분석에 비해 검출한계 및 정량한계가 높은 수준으로 분석되고 있으며, 동시 분석하는 펩타이드마다 검출한계 및 정량한계의 차이가 크게 보고되고 있다. 이러한 단점을 극복하는 연구 결과가 보고된다면 LC-MS 동시다중분석법은 식품 알레르겐 분석의 정확성 뿐만 아니라 분석 편리성까지 갖춘 이상적인 분석법으로 널리 이용될 수 있을 것이다.

Ⅲ. 결론

식품알레르기는 식품 안전 분야의 중요한 이슈로 떠오르고 있다. 식중독 균 등 생물학적 위해요소나 중금속 등 화학적 위해요소는 치료법이나 독성학적 자료가 구비되어 있는 것이 많으나, 식품알레르기는 알레르기 반응을 유발하는 해당 식품을 제한하는 것이 유일한 대안책이며 알레르기 반응의 역치 또한 불분명하며 개인차가 크기 때문에 연구의 제한점이 있다. 따라서 식품알레르기 환자들에게 식품 표면의 라벨을 통해 믿을 수 있는 안전한 식품을 제공하는 것이 중요하다. 이를 위해, 산업체에서는 구역 구분, 알레르겐을 제거할 수 있는 세척 방법 이용 등을 통해 가공시설 내 교차오염을 철저히 방지하여야 하며, 정부와 학계에서는 한국 식품알레르기 유발물질 표시제도에 포함된 알레르겐 의 LC-MS법 개발 및 검증을 통한 확정 검출이 가능한 시험법을 마련하여, 상업적 ELISA kit 이용 시

상이한 결과로 인해 발생할 수 있는 법적 다툼을 미연에 방지하고 정부의 권위를 높임과 동시에 국민에게 안전한 식품을 제공할 수 있는 방법을 모색해야 할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Fæste, C.K., Rønning, H.T., Christians, U., Granum, P.E. (2011) Liquid chromatography and mass spectrometry in food allergen detection. *Journal of Food Protection*, 74(2): 316–345.

2. Kim W.K. (2006) Diagnosis and treatment of food allergy in children. *Pediatric Allergy and Respiratory Disease*, 16: 274–83.

3. Prado, M., Ortea, I., Vial, S., Rivas, J., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J. (2016) Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(15): 2511–2542.

4. US Food and Drug Administration. (2017) Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts. Available at: https://www.fda.gov/safety/recalls/ [Accessed 01/12/2017]

5. US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (Title II of Public Law 108-282). Available at: http://www.cfsan.fda.gov/~dms/alrgact.html [Accessed 27/11/2017]

6. European Union. (2007) Commission Directive 2007/68/EC. Available at: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:310:0011:0014:EN:PDF [Accessed 27/11/2017]

7. Consumer Affairs Agency, Government of Japan. (2011) Guidelines for labeling foods containing allergens. Available at: http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin1094_1.pdf [Accessed 27/11/2017]

8. 식품의약품안전처. (2015) 식품의약품안전처 고시 제 2015-20호. Available at: http://www.mfds.go.kr/index.do?searchkey=title:contents&mid=686&pageNo=13&seq=9543&cmd=v [Accessed 25/11/2017]

9. Poms, R.E., Klein, C.L., Anklam, E. (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21(1): 1–31.

10. Chen, Q., Zhang, J., Ke, X., Lai, S., Tao, B., Yang, J., Mo, W., Ren, Y. (2015) Quantification of bovine ß-casein allergen in baked foodstuffs based on ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants. Part A*, 32(1): 25–34.

11. Hoffmann, B., Münch, S., Schwägele, F., Neusüß C., Jira, W. (2017) A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products. *Food Control*, 71: 200–209.

12. US Food and Drug Administration. Approaches to Establish Thresholds for Major Food Allergens and for Gluten in Food. Available from: https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Allergens/ucm106108.htm#ii [Accessed 30/11/2017]

13. Shefcheck, K.J., Callahan, J.H., Musser, S.M. (2006). Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7953–7959.

14. McLafferty, F.W., Breuker, K., Jin, M., Han, X., Infusini, G., Jiang, H., Kong, X., Begley, T.P. (2007) Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *The FEBS journal*, 274: 6256–6268.

15. Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20: 3551–3567.

16. Stahl, D.C., Swiderek, K.M., Davis, M.T., Lee, T.D. (1996) Data-controlled automation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of peptide mixtures. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 7(6): 532–540.

17. Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R. (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology*, 4:222, 1–14.

18. Rauniyar, N. (2015) Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. International *Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 28566-28581.

19. Monaci, L., Losito, I., Palmisano, F., Visconti, A. (2010) Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(26): 4300-4305.

20. Monaci, L., Nørgaard, J.V., van Hengel, A.J. (2010) Feasibility of a capillary LC/ESI-Q-TOF MS method for the detection of milk allergens in an incurred model food matrix. *Analytical Methods*, 2: 967-972.

21. Ansari, P., Stoppacher, N., Rudolf, J., Schuhmacher, R., Baumgartner, S. (2011). Selection of possible marker peptides for the detection of major ruminant milk proteins in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(3): 1105-1115.

22. Newsome, G.A., Scholl, P.F. (2013) Quantification of allergenic bovine milk a(S1)-casein in baked goods using an intact ^{15}N-labeled protein internal standard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(24): 5659-5668.

23. Heick, J., Fischer, M., Pöpping, B. (2011) First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(7): 938-943.

24. Pilolli, R., De Angelis, E., Monaci, L. (2017) Streamlining the analytical workflow for multiplex MS/MS allergen detection in processed foods. *Food Chemistry*, 221: 1747-1753.

25. Montowska, M., Fornal, E. (2018) Detection of peptide markers of soy, milk and egg white allergenic proteins in poultry products by LC-Q-TOF-MS/MS. *LWT-Food Science and Technology*, 87: 310-317.

26. Weber, D., Raymond, P., Ben-Rejeb, S., Lau, B. (2006) Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5): 1604-1610.

27. Monaci, L., Pilolli, R., De Angelis, E., Godula, M., Visconti, A. (2014) Multi-allergen detection in food by micro high-performance liquidchromatography coupled to a dual cell linear ion trap massspectrometry. *Journal of Chromatography* A, 1358: 136-144.

28. Gomaa, A., Boye, J. (2015) Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). *Food Chemistry*, 175: 585-592.

29. Monaci, L., Pilolli, R., De Angelis, E., Carone, R., Pascale, M. (2016) LC.tandem mass spectrometry as a screening tool for multiple detection of allergenic ingredients in complex foods. *ACTA IMEKO*, 5(1): 5-9.

30. Ji, J., Zhu, P., Pi, F., Sun, C., Sun, J., Jia, M., Ying, C., Zhang, Y., Sun, X. (2017) Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of the main milk allergens. *Food Control*, 74: 79-88.

31. De Angelis, E., Pilolli, R., Monaci, L. (2017) Coupling SPE on-line pre-enrichment with HPLC and MS/MS for the sensitive detection of multiple allergens in wine. *Food Control*, 73: 814-820.

32. Azarnia, S., Boye, J.I., Mongeon, V., Sabik, H. (2013) Detection of ovalbumin in egg white, whole egg and incurred pasta using LC-ESI-MS/MS and ELISA. *Food Research International*, 52(2): 526-534.

33. Rombouts, I., Lagrain, B., Brunnbauer, M., Delcour, J.A., Koehler, P. (2013) Improved identification of wheat gluten proteins through alkylation of cysteine residues and peptide-based mass spectrometry. *Scientific reports*, 3:2279, 1-11.

34. Prandi, B., Faccini, A., Tedeschi, T., Galaverna, G., Sforza, S. (2013) LC-MS analysis of proteolytic peptides in wheat extracts for determining the content of the allergen amylase/trypsin inhibitor CM3: Influence of growing area and variety. *Food Chemistry*, 140(1-2): 141-146.

35. Sealey-Voyksner, J.A., Khosla, C., Voyksner, R.D., Jorgenson, J.W. (2010) Novel aspects of

quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography – mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25): 4167–4183.

36. Careri, M., Costa, A., Elviri, L., Lagos, J.B., Mangia, A., Terenghi, M., Cereti, A., Garoffo, L.P. (2007) Use of specific peptide biomarkers for quantitative confirmation of hidden allergenic peanut proteins Ara h 2 and Ara h 3/4 for food control by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6): 1901–1907.