pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 3, pp. 185~192 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.3.185

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

수산가공식품 중 알레르겐 고등어 혼입여부 신속 검출을 위한 간접효소면역분석법의 개발

이정은 · 김아윤 · 김솔아 · 김효인 · 박지혜 · 심원보[1,2]*
경상대학교 응용생명과학부, [1]경상대학교 농업생명과학연구원, [2]경상대학교 농화학식품공학과

Development of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent assay for Rapid Detection of Adulteration of Food Allergen Mackerel in Processed Marine Foods

Jeong-Eun Lee, Ah-Yoon Kim, Sol-A Kim, Hyo-In Kim, Ji-Hye Park, and Won-Bo Shim[1,2]*
Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Korea
[1]Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea
[2]Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Korea
(Received April 10, 2018/Revised May 3, 2018/Accepted May 28, 2018)

ABSTRACT - The purpose of this study was to develop an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) based on a monoclonal antibody (MAb) that is specific to mackerel thermal stable-soluble protein (TSSP), that can be used for the rapid detection of mackerel in processed marine foods. Among the four MAbs (3A5-1, 2, 9, and 12) developed in previous studies, the 3A5-2 MAb that showed high specificity and sensitivity were selected and used to develop the indirect ELISA method. The detection range of the indirect ELISA was 0.02%-0.001% and the detection limit of 0.001% was shown. No cross-reaction to other marine products and food ingredients was observed by the indirect ELISA. Processed marine foods containing mackerel with ≥ 0.3 O.D. value at 405 nm were estimated as positive samples by the indirect ELISA. Therefore, the indirect ELISA can be used as a rapid and sensitive method to identify mackerel authenticity and adulteration in processed marine foods.

Key words : Mackerel, Indirect ELISA, Processed marine food, Authenticity, Adulteration

식품 알레르기의 발병은 인체의 면역체계와 깊은 관련이 있으며 특정 항원이 포함된 식품을 섭취하거나 접촉·호흡했을 때 체내 면역글로불린(IgE)이 과도하게 반응하여 나타나는 현상으로, 대다수 사람에게는 별 영향이 없는 식품이지만 특이 체질을 가진 사람은 식품 알레르겐으로 인해 비정상적인 면역반응을 일으킨다. 증상으로는 두드러기·혈관 부종·아토피 피부염 등과 같은 피부 증상이 흔하게 나타나며 설사·구토·복통 등의 소화기 증상과 심한 경우 기관지가 확장되면서 기도가 좁아져 호흡곤란에 이를 수 있다[1-3].

보통 식품 알레르기는 영유아나 초등학생에게 알레르기 반응이 두드러지게 나타나며 성인의 경우 체질의 변화나 신체의 면역력이 저하되었을 경우에 나타나게 된다. 이러한 식품 알레르기 반응은 식품 섭취 후에 바로 나타나는 즉시형도 있지만 1~2일 후에 나타나는 지연성 반응도 있다. 그러므로 후자의 경우는 명확한 인과관계를 찾지 못해 원인식품을 알 수 없는 경우도 빈번하게 발생한다[4]. 식품은 여러가지 성분이 혼합된 것으로 주의를 기울이지 않으면 단체급식소 및 레스토랑에서 제공하는 음식 또는 판매되고 있는 가공식품의 섭취로 인해 알레르기 사고가 발생할 가능성이 높으며 2018년 한국소비자원에서는 최근 2년간 식품 알레르기 위해사고가 약 2배가량 증가하였다고 보고하였다[2,3].

식품 알레르기를 유발하는 원인식품 중 하나인 수산물은 국내의 식생활에서 중요한 단백질 공급원으로 인식되어 전체 식품 섭취량의 30% 정도에 해당될 만큼 높은 비중을 차지하고 있다[24]. 그러므로 수산물을 이용한 가공식

*Correspondence to: Won-Bo Shim, Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea
Tel: 82-55-772-1902, Fax: 82-55-772-1909
E-mail: wbshim@gnu.ac.kr

품의 다양화 및 생산량의 증가로 인해 레스토랑 및 단체급식소에서도 수산물을 이용한 음식의 제공이 증가하고 있다. 따라서 현대사회에서는 식품 알레르기에 대한 관리가 개인뿐만 아니라 집단 차원에서도 매우 중요해지고 있다[5]. 최근에는 대전에 소재한 학교 단체급식소에서 고등어에 의한 식품 알레르기 사고가 발생하였고, 단체급식이 이루어지고 있는 학교의 100명 중 13명이 식품과 관련된 알레르기 사고를 경험한 바 있다고 한다. 그러나 현재까지도 일반 레스토랑 및 일부 단체급식소에서 식품 알레르기에 관한 위험성 및 예방·관리에 대한 인식은 부족한 현실이다[6].

식품의약품안전처는 2017년 5월 "어린이 기호식품 등의 알레르기 유발 식품 표시기준 및 방법"을 제정·고시하여 제과·제빵류, 아이스크림류, 햄버거, 피자 등을 조리·판매하는 식품접객업소에서는 난류(가금류에 한한다), 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토, 아황산류(이를 첨가하여 최종제품에 SO_2로 10 mg/kg 이상 함유한 경우에 한한다) 총 21종의 알르레기 유발 식품을 사용 또는 함유하는 경우에는 반드시 눈에 띄기 쉽게 바탕색과 구별되는 색상으로 표시하도록 의무화하였다[21]. 이러한 정책은 국내에서도 식품 알레르기의 위험성과 관리·예방의 필요성을 인지하고 관리 방안을 마련하고 있다는 것을 의미한다.

알레르기를 유발하는 식품 알레르겐의 함유유무를 확인하는 방법으로는 크게 기기분석법(HPLC와 LC-MS/MS), 특이항체를 이용하는 면역분석법(ELISA, immuno-strip), 대상 DNA를 검출하는 유전자검사법(PCR)으로 나눌 수 있다[15,16]. 그러나 HPLC법은 표준품과의 머무름시간(retention time)을 비교하고, DAD (diode array detector)에서의 spectra를 확인하는 것이 유일한 화학적 정보이며, 분석물질의 표준품을 반드시 확보하고 있어야 하는 단점이 있다. 또한, LC-MS/MS 분석법은 각 성분에 대한 높은 선택성과 고감도 및 빠른 분석시간, 전처리의 용이성 등으로 HPLC 분석법과 GC 분석법의 장점을 모두 가지고 있는 방법이지만 분석 장비가 매우 고가이어서 아직까지는 범용으로 사용하기가 어렵다는 단점이 있다. 유전자검사법은 conventional PCR법과 real-time PCR법 등이 식품 알레르겐 검출에 이용되고 있으며, real-time PCR법의 경우 증폭과정을 실시간으로 모니터링 할 수 있고 추가적인 전기영동 확인과정이 없이 정성시험과 정량시험이 모두 가능하다는 장점이 있지만 여전히 현장에서 사용하기에는 고가의 장비와 분석에 소요되는 시간이 필요하다는 단점을 갖고 있다[19]. 실제로 식품산업현장에서 식품 알레르겐의 혼입유무 및 식품 알레르겐을 사용한 시설 및 설비 공정에서의 세척효과를 확인하기 위해 ELISA법과 immuno-strip 등의 면역분석법 kit들이 주로 사용되고 있다. 그러나 현재 개발되어 판매되고 있는 면역분석법 kit들은 알레르기를 유발하는 특정 단백질을 대상으로 개발하였기 때문에 이들 단백질이 살균 및 조리 공정 등의 열처리 과정 중에 변성되면 실제 가공식품에는 적용하기 어려움이 있다고 보고되고 있다[9]. 현재까지 보고된 연구문헌 중 가공식품에 알레르기 검출 ELISA kit를 적용하였을 때 시판되고 있는 제품 kit 중 약 0.5~0.05%만이 가공식품 중 식품 알레르겐의 혼입유무를 검출할 수 있다고 보고하였다[18]. 또한 손과 김(2012)은 고등어에 대한 다크론성 항체를 이용하여 ELISA법을 개발하였으나 고압멸균 제품에서 분석하기에는 어려움을 보고하였다[13]. 국내의 식품 알레르겐 면역분석법 개발은 여전히 미흡하며 식품산업현장에서 신속하게 분석할 수 있는 방법이 체계화되어 있지 않은 실정이다. 따라서 식품 알레르기 사고로 인한 위험을 배제할 수 있도록 가공식품 중에 식품알레르겐을 신속하게 검출하기 위한 분석법을 개발할 필요성이 있다[7].

본 연구팀은 이전의 연구에서 고등어 어육 중 열 안정-수용성 단백질의 존재와 이에 대한 단크론성 항체를 보고하였고[6], 이러한 열 안정-수용성 단백질은 가공식품 중 존재하는 식품알레르겐의 존재 여부를 확인할 수 있는 마커로써 이용이 가능하다는 것을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 이전의 연구에서 개발한 고등어 어육 중 열 안정-수용성 단백질에 특이한 단크론성 항체를 이용하여 간접효소면역분석법(indirect ELISA)을 개발하였고, 수산가공식품 중 식품 알레르겐으로서의 고등어 어육 혼입여부를 확인하는데 활용하고자 하였다.

Materials and Methods

시료 및 재료

본 실험에는 대형마트에서 판매하고 있는 고등어 및 고등어 가공식품류(통조림, 수산물가공품), 꽁치 및 삼치를 사용하였다. 실험에는 Nunc사(Roskilde, Denmark)의 microplate와 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 bovine serum albumin (BSA), ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)], polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) 그리고 Hydrogen peroxide (H_2O_2)를 구입하여 사용하였고, goat anti-mouse IgG (H+L) peroxidase conjugate는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL, U.S.A.), filter paper (Whatman No. 1)의 경우 Whatman (Buckinghamshire, UK), skim milk는 BD Difco (Le Pont de Claix, France)로부터 구입하였다. 그 외 indirect ELISA에 사용된 0.05 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), citrate buffer (pH 4.5)와 0.05% Tween 20이 포함된 PBS (PBST, pH 7.4), 포화 ammonium sulfate와 단백질 추출 및 희석에 사용된 0.15 M sodium chloride, 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6), 25 mM tris-buffered saline (pH 7.4, TBS), 20 mM tris-HCl (pH 6.8)은 본 연구

실에서 준비하여 실험에 사용하였다. indirect ELISA결과는 TECAN사 (Durham, USA)의 기기를 사용하여 흡광도를 405 nm에서 측정하였다[6].

단크론성 항체 생산

수산가공식품 중 고등어의 혼입여부를 확인할 수 있는 indirect ELISA법을 개발하기 위해 이전의 연구에서 보고한 고등어 어육 중 열 안정-수용성 단백질에 특이적인 단크론성 항체를 사용하였다[6]. 단크론성 항체는 4종(3A5-1, 2, 9, and 12 MAb)의 하이브리도마(hybridoma)로부터 생산하였다. 간략히 설명하면 10주령 이상의 mouse 복강에 pristane (2,4,10,14-tetramethyl pentadecane, Sigma, USA)을 0.5 mL를 주입하고, 1주일 후 대량 증식한 하이브리도마를 수거하여 세포수를 0.2 mL 당 1×10^7 cell이 되도록 계산하여 mouse 복강에 주입하였다. 약 7~8일 후 복강으로부터 복수액을 채취하여 3,000 rpm에서 원심분리 후 상등액을 ammonium sulfate 침전법으로 정제하였고, 정제된 항체는 0.05 M PBS로 3일간 투석 후 동결 건조시킨 상태로 −20°C에서 보관하면서 이후의 실험에 사용하였으며, 정제된 항체의 단백질 농도를 측정한 결과 4종의 항체 모두 3 mg/mL의 수준이었다.

간접효소면역분석법(indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA)의 개발

정제된 단크론성 항체를 이용하여 수산가공품 중 식품알레르겐 고등어 혼입여부의 신속검출을 위해 민감도와 특이성이 높은 분석법을 개발하고자 indirect ELISA법의 각 단계인 coating, blocking, 1차 항체, 2차 항체에 대한 조건을 최적화 하였다.

Coating 단계에 대한 최적 조건 확립을 위하여 본 연구에서는 시료 추출 후 일반적으로 coating에 사용되는 버퍼인 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6), 0.05 M PBS (pH 7.4), 25 mM tris-buffered saline (pH 7.4), 20 mM Tris-HCl (pH 6.8)로 희석하여 microplate에 100 μL씩 분주한 후 coating 온도 및 반응시간을 37°C, 4°C에 1시간, 2시간, overnight 조건으로 진행하여 가장 민감도가 높은 coating 조건을 선택하였다. Blocking은 주로 사용되는 BSA (0.5%, 1%)와 skim milk (0.5%, 1%)를 사용하여 반응시간 및 온도 등을 결정하였다. 각 well 당 200 μL씩의 blocking 용액을 분주하였으며, 37°C에서 1시간, 4°C에서 하룻밤(overnight) 정치시켜 반응을 유도하였으고 indirect ELISA 실험 결과 효과적으로 비특이적인 반응을 제거해주는 조건을 선택하였다. 1차 항체의 조건은 확립된 coating 및 blocking 조건에 정제한 항체를 0.05 M PBS로 약 1~100 ng/mL의 농도로 희석하여 각 well 당 100 μL씩 분주하고 37°C에서 1 시간 동안 반응하였으며, 2차 항체는 1~250 ng/mL로 PBS에 희석하여 각 well 당 100 μL씩 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 민감도가 높은 최적의 1, 2차 항체 희석배수를 선정하였다. 모든 실험 결과는 TECAN 기기로 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 모든 실험은 3반복 처리하여 얻은 평균값을 사용하였다.

수산가공식품 중 고등어 검출

개발된 indirect ELISA법에 대해 수산가공품 중 식품알레르겐 고등어의 혼입여부를 확인할 수 있는 분석법으로의 활용가능성을 평가하였다. 먼저 고등어와 동일한 등푸른생선인 삼치와 꽁치를 이용하여 고등어의 선택적 판별여부를 평가하였다. 냉동 고등어, 삼치 및 꽁치를 해동 후 일반 믹서기를 이용하여 어육을 분쇄시키고 각 시료를 유리 tube에 5 g 씩 취하여 추출 효율이 높은 10 mL의 0.05 M carbonate buffer를 첨가한 후 vortex를 사용하여 30초 동안 균질화 하였다. 균질화된 시료는 100°C 끓는 물에서 15분 동안 중탕하여 추출하는 열처리(heating) 추출법을 사용하였으며, 추출물은 50 mL의 conical tube로 옮겨 3,221 × g에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 분리하였고 indirect ELISA 분석법에 사용하였다.

추가로 개발된 indirect ELISA법을 이용하여 수산가공식품 중 고등어 검출 가능여부를 확인하였다. 먼저 실험실에서 준비한 시료는 마트에서 구입한 냉동 고등어 시료를 해동 후 15, 30, 45, 60분씩 끓는 물에서 중탕하여 준비하였고, 통조림 제조에서 이용되는 고압멸균 조건으로 121°C에서 15분, 30분 처리하여 준비하였다. 시판 수산가공 식품은 마트에서 즉석으로 조리하여 판매하고 있는 고등어구이 제품 3점과 A와 B사의 고등어 통조림 제품과 그 외 꽁치 통조림을 구입하여 실험에 사용하였다. 통조림 제품은 침지액을 충분히 제거한 후 시료로 사용하였으며, 수산가공식품의 전처리는 앞서 설명한 방법과 동일한 방법으로 0.05 M carbonate buffer를 이용하여 추출한 후 상층액을 indirect ELISA로 분석하였다.

Results and Discussion

단크론성 항체 선택

고등어 어육 중 열 안정-수용성 단백질에 특이적인 단크론성 항체 4종을 앞서 설명한 바와 같이 ammonium sulfate 법으로 정제하였고, 정제된 항체 4종 중 가장 역가가 높은 항체 1종을 선택하여 indirect ELISA의 최적화를 진행하고자 하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 4종의 항체를 이용하여 indirect ELISA를 실시한 결과 3A5-1, 3A5-2, 3A5-9와 3A5-12 항체 모두 민감도가 비슷한 것으로 확인되었지만 3A5-2 항체가 고등어 함유량 0.01%에서도 다른 3종의 항체보다 높은 흡광도인 0.749를 나타내어 민감도 측면에서 우수한 것으로 확인되었다. 그러므로 이후 실험에서는 3A5-2 항체를 이용하여 indirect ELISA법 개발

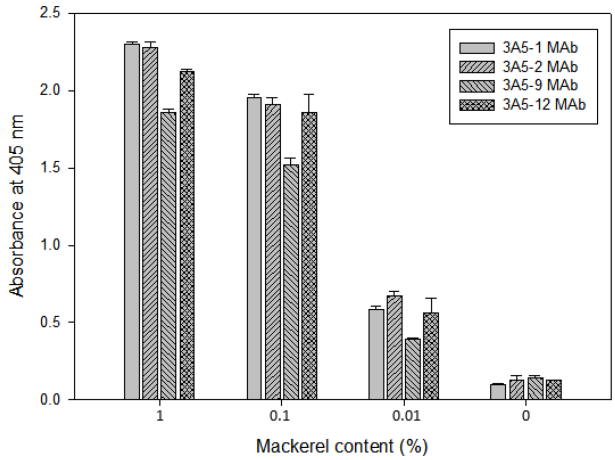

Fig. 1. Selection of a monoclonal antibody for the development of Indirect ELISA.

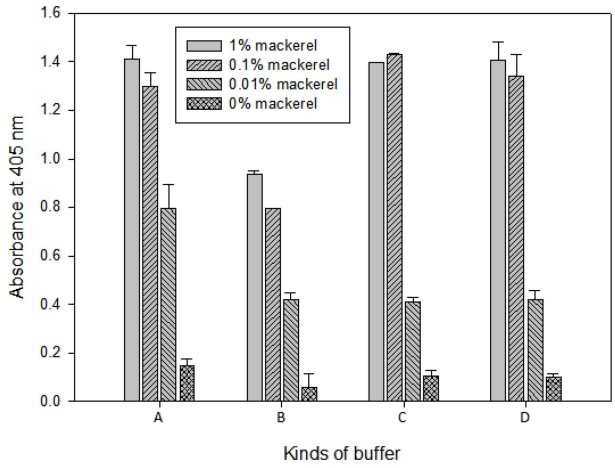

Fig. 2. Development of highly sensitive Indirect ELISA based on 3A5-2 MAb by selecting an optimum dilution buffer as a coating buffer for sample extracts. A: 0.05 M PBS (pH 7.4), B: 0.05 M Carbonate (pH 9.6), C: 20 mM Tris-HCl (pH 6.8), D: 25 mM TBS (pH 7.4).

을 최적화하였다.

Indirect ELISA법의 최적화

수산가공품 중 식품 알레르겐 고등어의 신속검출 및 혼입여부를 확인할 수 있는 indirect ELISA법 개발을 위해 각 단계인 coating, blocking, 1차 항체, 2차 항체에 대한 조건을 최적화 하였다. 분석법의 민감도를 높이기 위해 Chen 등[14]의 방법을 변형하여 0.05 M carbonate buffer와 0.05 M PBS로 단백질을 추출한 후 indirect ELISA의 코팅항원으로 사용한 결과 고등어 함유량 0.01%에서 0.05 M carbonate buffer로 추출한 시료의 흡광도 값이 0.58로, 0.05 M PBS로 추출한 시료(흡광도 0.18)보다 높은 흡광도를 나타내었다. 따라서 민감도가 높은 indirect ELISA법

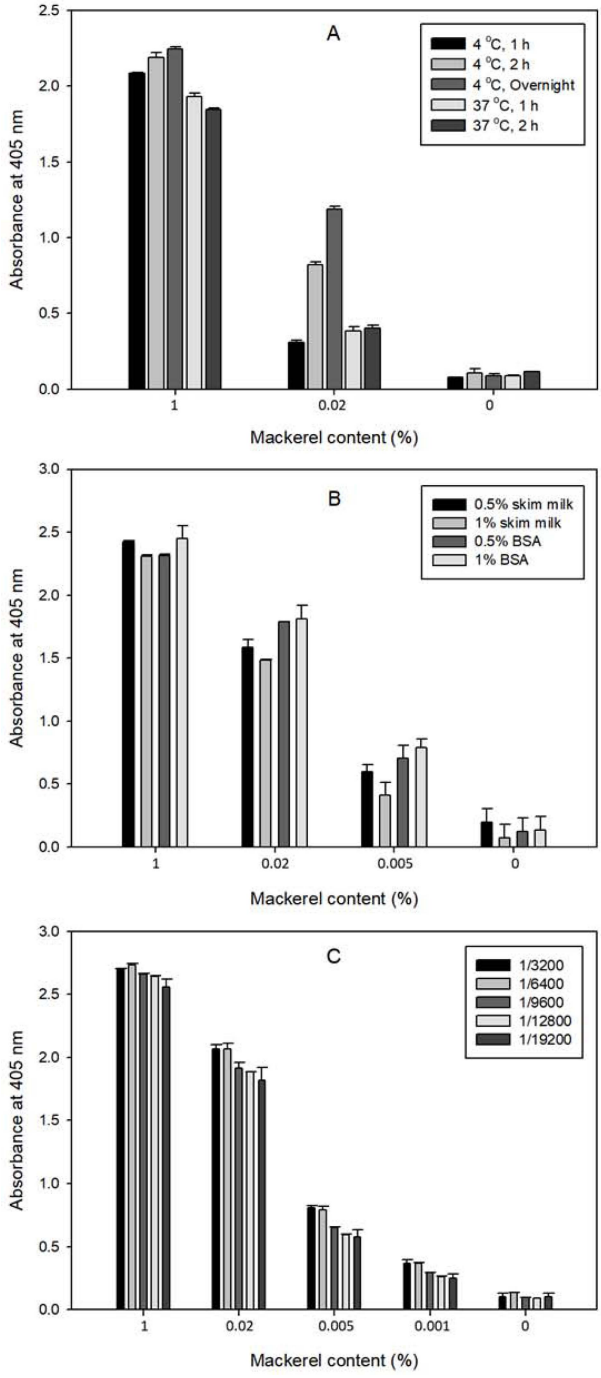

Fig. 3. Optimization of experimental factors for the development of highly sensitive Indirect ELISA based on 3A5-2 MAb. A: coating conditions (temperature and time), B: blocking solution, C: dilution of primary antibody.

을 개발하기 위한 추출용매로 0.05 M carbonate buffer를 선택하였다. 또한 Fig. 2에서 보는바와 같이 고등어 추출액의 희석버퍼에 따른 민감도를 확인한 결과 고등어 함유량 0.01%에서 총 4종의 희석버퍼의 흡광도 값이 0.05 M carbonate buffer에서 0.17, 0.05 M PBS 0.42, 25 mM tris-

buffered saline와 20 mM Tris-HCl에서는 0.4로 확인되었다. 따라서 고등어 시료 추출액을 0.05 M PBS로 희석한 후 indirect ELISA법의 시료로 코팅한 경우가 가장 높은 민감도를 나타내었기 때문에 indirect ELISA법을 위한 시료 전처리는 방법은 고등어 시료를 0.05 M carbonate buffer로 추출하고 이를 0.05 M PBS로 1:1 희석하는 조건으로 확립하였다. 준비된 시료를 이용하여 indirect ELISA법의 coating 반응 온도 및 시간을 비교한 결과 Fig. 3A에서 보는 바와 같이 고등어 함량 0.02%에서 4°C에서 overnight 반응시킨 조건이 흡광도 1.25로 확인되었고, 그 외 4°C 및 37°C에서 1, 2시간 반응시킨 조건들은 약 0.4-0.8 흡광도를 나타내었다. 따라서 높은 민감도의 분석법 확립을 위해서 4°C에서 overnight 반응을 coating 조건으로 선택하였다.

추가로 비 특이적인 반응을 효과적으로 제거하기 위한 최적의 blocking 조건 확립을 위해 0.5와 1% BSA와 skim milk를 blocking 용액을 사용하여 실험한 결과 고등어 함유량 0%에서 나타난 흡광도 값이 0.08-0.1로 모두 효과적으로 비 특이적인 반응을 제거해주는 것을 확인할 수 있었으나 고등어 함유량 0.005%에서의 흡광도 값을 비교한 결과 1% BSA 용액을 사용하였을 때 비 특이적인 반응이 낮으면서 가장 높은 흡광도 0.8 값이 나타나 이를 최종 선택하였다(Fig. 3B). 또한, blocking의 온도와 시간에 따른 반응성을 확인한 결과 모든 조건에서 유사한 결과를 보였기 때문에 반응시간을 단축할 수 있는 37°C, 1시간 조건을 선택하였다.

항체의 경우 농도를 선정할 때 저농도의 항체는 낮은 민감도를, 고농도의 항체는 비 특이적인 반응을 유도할 수 있기 때문에 분석법 개발 시 항체의 농도를 최적화시키는 것은 매우 중요하다. Fig. 3C에서 보는 바와 같이 1차 항체의 최적 희석배수를 결정하기 위해 1차 항체원액(1 mg/mL)을 3200, 6400, 9600, 12800, 19200배로 희석하여 실시한 indirect ELISA결과에서 0, 0.001, 0.005, 0.02, 1%의 코팅항원에 대해 3200과 6400배의 항체 농도가 비특이적인 반응없이 유의적으로 높은 흡광도를 나타내었다. 또한 고등어 함유량 0.001%에서 3200과 6400배로 희석한 항체의 흡광도가 각각 0.4로 두 희석배수 사이에 큰 차이가 나타나지 않아 6400배를 선택하였다, 이상의 결과로 볼 때 최적의 indirect ELISA 조건으로 coating은 4°C, overnight, blocking은 1% BSA, 37°C, 1시간, 마지막으로 1차 항체는 6400배, 37°C, 1시간으로 결정하였다.

개발된 indirect ELISA법의 평가

앞서 개발된 indirect ELISA법에 대해 민감도와 특이성을 확인하였다. 민감도 측정을 위해 고등어 추출액을 0.05 M PBS로 1, 0.2, 0.1, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002, 0.001, 0%로 희석한 후 indirect ELISA로 확인한 결과 Fig. 4A에서

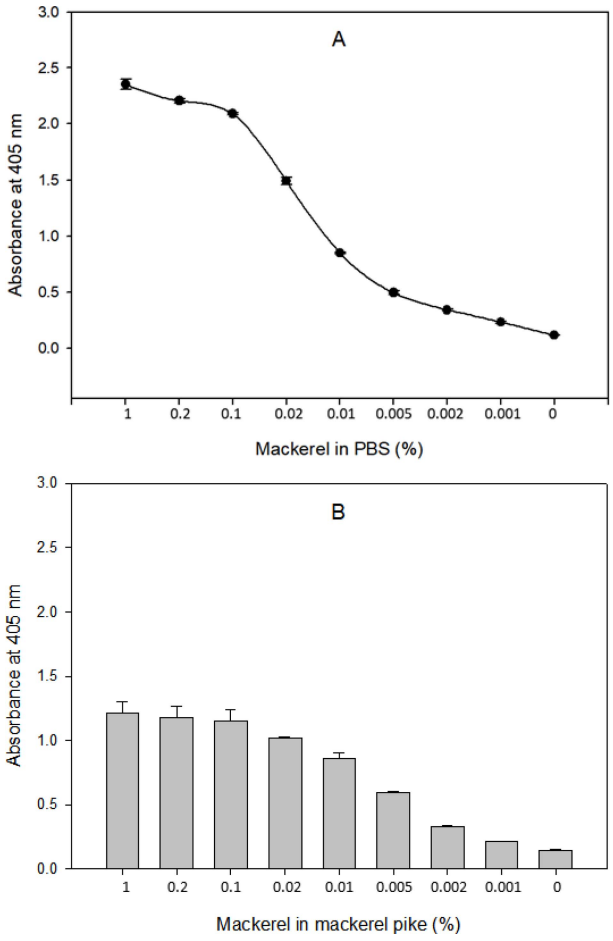

Fig. 4. Standard curve of the Indirect ELISA based on 3A5-2 MAb according to concentration of mackerel extracts in PBS (A) and the results of the Indirect ELISA for artificially adulterated mackerel in mackerel pike (B).

보는 바와 같이 0.001% (0% 흡광도 표준편차 양의 값: 0.0003 × 3) 까지 측정이 가능한 민감도 높은 분석법으로 확인 되었다. 또한, 최적화된 indirect ELISA법의 특이성을 확인하기 위해 식품알레르겐으로 알려진 수산물(꽁치, 삼치, 볼락, 새우, 오징어), 너트류 및 콩류(땅콩, 호두, 아몬드, 캐슈넛, 대두) 및 축산물(소고기, 돼지고기, 염소고기, 오리고기, 난백)을 앞서 언급한 바와 같이 0.05 M carbonate buffer로 추출한 후 indirect ELISA로 분석한 결과 Table 1과 같이 다른 수산물, 너트류 및 콩류, 축산물에서는 0.084-0.187의 낮은 흡광도를 나타내었고, 고등어에서는 2.475로 높은 흡광도 값이 확인되어 개발된 indirect ELISA법은 고등어를 특이적으로 분석할 수 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 본 연구에 사용된 3A5-2 항체가 이전의 연구에서 보고한 바와 같이 고등어의 어육 중 열 안정-수용성 단백질에 특이하게 반응하는 것에 기인한 것으로 판단된다[6]. Son과 Kim[13]도 가공식품 중 고등어 parvalbumin의 검출을 위한 sandwich ELISA법을 보고하

Table 1. Analysis of processed marine foods, meats, egg white, and nuts by the Indirect ELISA based on 3A5-2 MAb

Sample	Absorbance at 405 nm	Classification
Mackerel	2.475	+[1)]
Mackerel pike	0.175	-[2)]
Spanish mackerel	0.173	-
Rock fish	0.171	-
Shrimp	0.156	-
Squid	0.119	-
Pork meat	0.177	-
Beef meat	0.133	-
Chicken meat	0.151	-
Duck meat	0.109	-
Roasted peanut	0.098	-
Walnut	0.084	-
Almond	0.157	-
Cashew nut	0.187	-
Soybean	0.121	-
Egg white	0.107	-
Grilled mackerel A	2.089	+
Grilled mackerel B	1.16	+
Grilled mackerel C	1.342	+
Canned mackerel A	0.641	+
Canned mackerel B	0.792	+

[1)]+: Positive, O.D ≥ 0.3
[2)]-: Negative, O.D < 0.3

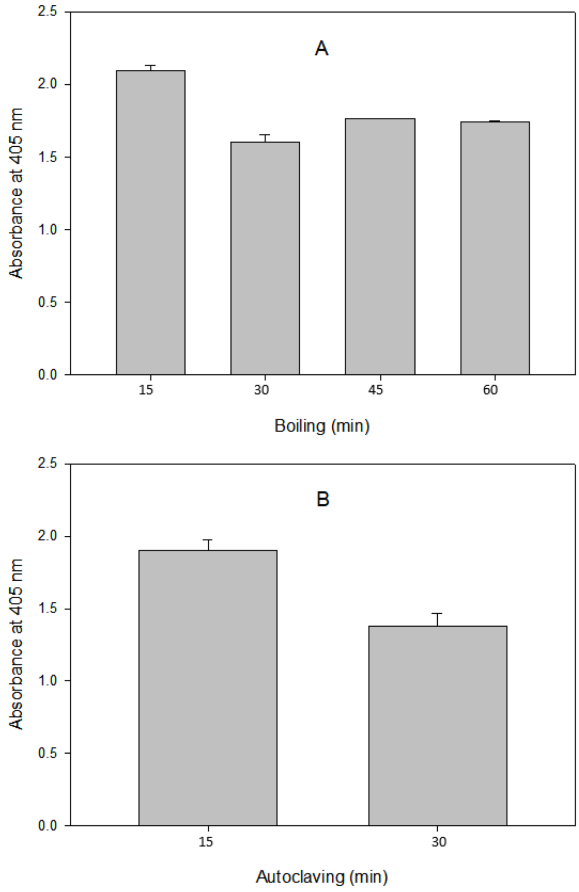

Fig. 5. Measurement of protein antigenicity in mackerel extracts treated by heating at boiling water (A) and autoclaving at 121°C (B).

였고, 검출한계는 3 ng/mL 수준(고등어 총 함량 0.01% 수준)으로 보고하였다[13]. 본 연구에서 개발된 indirect ELISA은 이미 보고한 ELISA법 보다는 더욱 민감한 분석법으로 확인되었다.

수산 가공 식품 중 고등어 어육 검출

고등어는 최근 2년 사이 어획량이 3분의 1로 급감(2015년 53,323톤 → 2017년 18,902톤)하여 가격이 상승하고 있으며, 국립수산과학원에서는 고등어의 부가가치를 위한 가공기술을 개발하고 있는 실정이다[22]. 따라서 고등어의 가격 상승으로 인해 꽁치, 청어 등이 고등어 가공품으로 둔갑될 가능성도 조심스럽게 예상이 되고 있다. 또한 식품의약품안전처에서 발표한 “어린이 기호식품 등의 알레르기 유발 식품 표시기준 및 방법” 고시에도 고등어는 식품알레르겐으로 표시하도록 관리하고 있다[21]. 따라서 본 연구에서는 앞서 개발한 indirect ELISA를 이용하여 식품 중 혼입된 고등어의 검출 가능 여부를 확인하였다. 우선 0.05 M carbonate buffer를 이용한 고등어 추출액을 꽁치 추출액으로 1, 0.2, 0.1, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002, 0.001, 0%로 희석한 후 indirect ELISA로 그 민감도를 확인하였다. Fig. 4B에서 보는 바와 같이 고등어-꽁치 추출물은 (0% 흡광도 표준편차 양의 값: 0.0006 × 3) 0.002% 까지 측정이 가능하였으며, 0%인 꽁치 시료에서는 0.175의 흡광도로 반응을 보이지 않았지만 고등어가 포함되어 있는 추출물에서는 0.3-1.25의 흡광도로 높은 반응성을 나타내었다. 다른 수산물 또는 식품재료의 성분이 indirect ELISA법에 간섭영향을 미치는지에 대해 추가연구가 필요하지만 개발한 분석법을 이용한다면 수산가공품 중 식품 알레르겐인 고등어를 분석하는데 있어 indirect ELISA법이 효과적으로 이용될 수 있을 것이라 판단된다.

추가로 개발한 indirect ELISA법을 적용하여 고등어 수산 가공품의 혼입여부를 판별할 수 있는지 확인하였다. 먼저 일반적인 식품가공공정에서의 제조과정으로 처리하였을 경우 항체가 인식하는 항원성의 유지정도를 확인하기 위해 구입한 고등어를 조리과정으로는 100°C에서 15분에서 60분까지 처리하였고, 멸균과정으로는 121°C에서 15분에서 30분까지 처리하였다. 처리된 시료는 앞서 설명한 방법과 같이 단백질을 추출하였고 indirect ELISA법으로 분석하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는바와 같이 조리과정 100°C에서 60분, 멸균과정 121°C에서 30분까지 처리한 고등어 시료 모두가 양성으로 확인되었고, 멸균을 30분 처

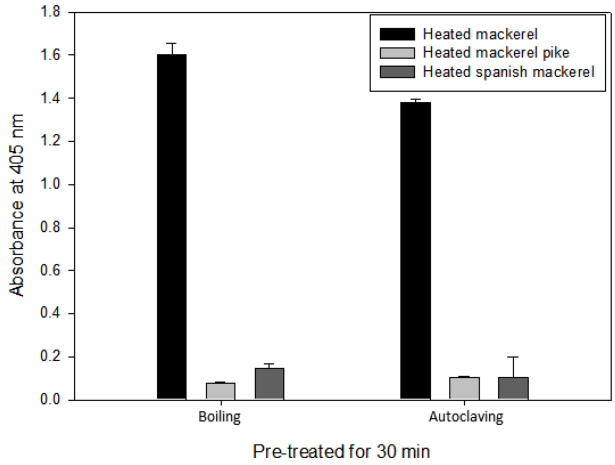

Fig. 6. Confirmation of availability of the Indirect ELISA based on 3A5-2 MAb to identify authenticity of mackerel.

리한 시료는 15분 처리한 시료와 비교했을 때 흡광도가 감소하는 것으로 확인되었으나 통조림 제조업체에 문의한 결과 일반적인 통조림 멸균 시간이 30분 이내인 것을 감안하면 indirect ELISA를 이용한 분석에는 문제가 없을 것으로 판단된다. 이러한 결과는 본 연구의 indirect ELISA법 개발에 사용된 3A5-2 항체가 고등어 어육 중 열안정-수용성 단백질(37 kDa)에 특이하게 반응하는 것으로 설명할 수 있으며, 열처리된 가공제품에서도 고등어를 충분히 검출할 수 있는 것으로 확인되었다. 고등어 혼입여부를 확인하는데 적용 가능여부를 확인하기 위해 고등어와 유사한 등푸른 생선인 꽁치와 삼치를 조리(100°C, 30분)와 멸균(121°C, 30분) 조건으로 각각 처리하고 이를 추출한 후 indirect ELISA법을 분석한 결과 Fig. 6에서와 같이 모든 조건에서 고등어는 높은 흡광도를 나타내어 양성으로 확인할 수 있었으나 꽁치와 삼치는 음성으로 확인되었다. 따라서 개발된 indirect ELISA법이 수산가공식품 중 고등어의 혼입여부를 확인하는 도구로써의 활용이 가능하다고 판단되었다. 손과 김의 parvalbumin을 항원으로 이용한 ELISA법은 100°C로 처리한 고등어 시료는 검출이 가능하였으나, 121°C에서 처리한 고등어 시료는 검출이 불가능하다고 보고하고 있다[13]. 그러나 본 연구에서 개발된 indirect ELISA법은 기존에 보고된 sandwich ELISA법에 비해 멸균제품까지 검출이 가능한 것으로 확인되었기 때문에 대부분의 가공식품에 적용이 가능한 분석법으로 활용이 가능할 것이라 예상된다.

추가로 마트에서 즉석으로 조리되어 판매하고 있는 고등어 구이, 조림(매콤조림, 간장조림)과 고등어 통조림 및 꽁치 통조림을 구입하여 indirect ELISA법으로 분석한 결과 Table 1과 같이 즉석조리제품인 구이와 조림 고등어 시료와 고등어 통조림 시료는 0.5 이상에서 1.0 이하의 흡광도를 확인하였고, 음성시료인 꽁치 통조림은 0.1 정도의 흡광도를 나타내었다. 이를 토대로 본 연구에서는 0.3(꽁치 시료의 흡광도 × 3) 흡광도 이하인 시료는 음성, 초과하는 시료는 양성으로 분류하였다. 통조림 및 몇몇 고등어 구이 제품에서는 흡광도가 낮게 확인되었는데, 이러한 이유는 검출대상 단백질을 둘러싸고 있는 주위 환경, 즉 서로 다른 식품의 특성(지방이나 염의 함량, pH 등)에서 유래하는 소위 매트릭스 효과(matrix effect)가 항원-항체 반응에 영향을 주었기 때문인 것으로 예상된다[10]. 특히, 직접적으로 열원에 노출되는 시료의 경우는 높은 열변성으로 인하여 항원성이 감소되었을 수도 있다. 그럼에도 불구하고 이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 고등어 어육 중 열 안정-수용성 단백질에 대한 특이항체 3A5-2를 이용하여 개발한 indirect ELISA법은 통조림과 같은 일부 식품에서 정량적인 확인이 어렵지만 일반적인 가공식품 중 고등어의 함유유무를 정성적으로 분석하는데 효과적으로 활용 가능한 것으로 판단된다[13].

Acknowledgement

이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(수산물 유해미생물 신속분리기술과 등온비색 PCR 기반 확립).

국문요약

본 연구에서는 수산가공품 중 고등어 어육을 신속하게 검출하기 위하여 고등어 어육 중 열 안정-수용성 단백질에 특이한 단클론성 항체(3A5-2)를 이용하여 indirect ELISA법을 개발하였다. Indirect ELISA을 개발하기에 앞서 먼저 시료 전처리는 이전 연구의 결과를 바탕으로 진행되었다. 이전 연구에서는 3A5-2 항체가 37 kDa 부근의 열 안정-수용성 단백질과 반응하였고[6], 0.05 M carbonate buffer로 추출하였을 때 흡광도가 가장 두드러지게 증가한 것을 확인하였다. 따라서 indirect ELISA의 시료 전처리는 0.05 M carbonate buffer를 이용한 열처리 추출법으로 추출한 후 0.05 M PBS로 희석하는 것으로 확립하였고, indirect ELISA법을 최적화하였다. 개발된 indirect ELISA법에 실험실에서 임의로 열처리한 고등어 샘플을 적용한 결과 indirect ELISA법은 0.001% (0% 흡광도 표준편차 양의 값: 0.0003 × 3)의 검출한계를 확인하였으며, 꽁치 중 고등어는 0.002% (0% 흡광도 표준편차 양의 값: 0.0006 × 3)까지 검출이 가능하였다. 또한 조리(100°C, 30분)와 멸균(121°C, 30분) 처리된 고등어의 검출이 가능한 것으로 확인되었고, 멸균된 제품에서도 고등어에 특이적으로 반응하여 고등어의 혼입여부 판별도 가능한 것으로 판단되었다. 시판되는 고등어 가공품에 대해서는 양성결과를 나타내었고 다른 수산물에서는 음성으로 판단되어 개발된 분석법은 가공품에 혼입

될 수 있는 알레르겐인 고등어를 보다 신속하고 민감하게 분석할 수 있고, 점차 가격이 증가하고 있는 고등어의 혼입여부를 확인할 수 있는 분석 도구로서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

References

1. Lee H.K., Song W.J., Ha T.U.: A single or combined effects of IL-4 and other various cytokines on IgE production of human tonsillar mononuclear cells. *Korean J. Immunol.,* **17**, 193-201 (1995).
2. Okunuki H, Teshima R, Sakushima J, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Sawada JI. Induction of active systemic anaphylaxis by oral sensitization with ovalbumin in mast-cell-deficient mice. *Immunol. Lett.,* **74**, 233-237 (2000).
3. Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immun.,* **108**, S65-S71 (2001).
4. Lim, K.M., Park S.M., Shim, B,S., Kim, S.K., Choi, S.L., Ahn K.S.: Effect of bulhwangeumjeonggi-san on cytokine levels of mouse th1/th2 cells and anti-allergic activity in ovalbumin-sensitized allergic inflammation model. Korean J. Oriental Physiology&Patholog., **20**(6), 1467-1476 (2006).
5. The Korean academy of asthma allergy clinical immunology. Asthma and Allergic Diseases. Yeomungag Press, 445-469 (2012).
6. Lee, J.E., Kim, J.S., Shim, W.B.:Production of A monoclonal antibody (mab) against a thermal stable-soluble protein in mackerel and confirmation of the properties for the MAb. *J. Food Hyg. Saf.,* **32**, 1-7 (2017).
7. George, C.W., Susott, R.A.: Effects of ammonium phosphate and sulphate on the pyrolysis and combustion of cellulose. *USDA Forest Service INT*-90 (1971).
8. Loiseau, O., Cottin, J., Robert, R., Tronchin, G., Mahaza, C., Senet. J.M.: Development and characterization of monoclonal antibodies specific for the genus *Listeria*. *Immunol. Med. Microbiol.,* **11**, 219-230 (1995).
9. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **76**, 4350-4354 (1979).
10. Faeste, C.K, Plassen C. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J. Immunol.,* **329**, 45-55 (2008).
11. Sletten G, Van Do T, Lindvik H, Egaas E, Florvaag E. Effects of industrial processing on the immunogenicity of commonly ingested fish species. *Int. Arch. Allergy Imm.,* **151**, 223-236 (2010).
12. Taylor SL, Nordlee JA, Niemann LM, Lambrecht DM. Allergen immunoassays-considerations for use of naturally incurred standards. *Anal. Bioanal. Chem.,* **395**, 83-92 (2009).
13. Son, D.H. and Kim, M.H.: Development of sandwich ELISA for the detection of mackerel in processed foods. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **44**(1), 1-7 (2012).
14. Chen, F.C., Hsieh, Y-H.P.: Porcine troponin I: a thermostable species marker protein. *Meat Sci.,* **61**, 55-60 (2002).
15. Nhari, R., Hafidz, R.M., Hamid, M., Rasli, N.M., Omar, A.R., Sheikha, E., Mustafa, S.: Monoclonal antibodies specific to heat-treated porcine blood. *J. Sci. Food Agric.,* **96**, 2524-2531 (2015).
16. Chen, F.C., Hsieh, Y-H.P., Bridgman, R.C.: Monoclonal antibodies to porcine thermal-stable muscle protein for detection of pork in raw and cooked meats. *J. Food Sci.,* **63**, 201205 (1998).
17. Marion, M., Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry,* **72**, 248-254 (1976).
18. Asensio, L., Gonzlez, I., Garca T., Martn, R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control,* **19**, 1-8 (2008).
19. Lee, J.H., Song, K. Y., Hyeon, J.Y., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Han, J. A., Chung, Y. H., Seo, K. H.: Comparison of standard culture method and real-time pcr assay for detection of *Staphylococcus aureus* in processed and unprocessed foods. *Korean J. Food Sci. An.,* **3**, 410-418 (2010).
20. Hwang, E.S., Lee, T.U. Jung, D.Y., Cho, H.S.; Development of loop-mediated isothermal amplification method for the rapid and sensitive detection of bovine tuberculosis in Korea native cattle. *Korean J. Veterinary Service.,* **4**, 333-339 (2011).
21. MFDS (Ministry of Food and Drug Safety): Ministry of Food and Drug Safety Notice 2017-15, Available from https://www.mfds.go.kr/index.do?mid=686&pageNo=1&seq=11721&sitecode/ Accessed Mar. 08 (2017).
22. KOSIS (Korean Statistical Information Service): A survey of fisheries production trends, Available from http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1W0002vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=F37&seqNo=&lang_mode=ko&language=kor&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE/ Accessed Aug. 25 (2017).
23. KCA (Korea Consumer Agency): Need to improve labeling system for food allergens, Available from http://www.kca.go.kr/brd/m_32/view.do?seq=2395&multi_itm_seq=0/ Accessed Mar. 14 (2018).
24. NSC (Norwegian Seafood Council): 2017 Research on marine product consumption, Available from https://norge.co.kr/contentassets/f77cd3f4658e475b9f22b1024eb6e90a/nsc_ seafood-study-2017/ Accessed Nov. 23 (2017).