pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 40, No. 5, pp. 374~381 (2025)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2025.40.5.374

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

새우 중 열안정-수용성 단백질에 특이적인 다클론 항체 생산 및 특성 확인

이송민[1] · 김혜진[1] · 김솔아[1] · 이정은[2] · 양희경[1] · 심원보[1,2,3,4]*

[1]경상국립대학교 대학원 응용생명과학부
[2]경상국립대학교 스마트팜연구소
[3]경상국립대학교 농업생명과학대학 식품공학부
[4]경상대학교 농업생명과학연구원

Production and Characterization of a Polyclonal Antibody Specific to Thermal Stable-Soluble Proteins in Shrimp

Song-Min Lee[1], Hye-Jin Kim[2], Sol-A Kim[1], Jeong-Eun Lee[3], Hee-Kyeong Yang[1], Won-Bo Shim[1,2,3,4,5]*

[1]*Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[2]*Division of Applied Life Science (BK21), Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[3]*Institute of Smart Farm, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[4]*Division of Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[5]*Institute of Agricultural and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*

(Received June 9, 2025/Revised September 1, 2025/Accepted September 15, 2025)

ABSTRACT - Shrimp is a valuable low-fat protein source often used in powders and sauces. For individuals with shrimp allergies, even trace amounts can be dangerous because of the presence of hidden allergens in processed foods. In the present study, we aimed to develop and characterize a polyclonal antibody (pAb) specific to thermally stable-soluble proteins (TSSPs) in shrimp and evaluate its potential for detecting shrimp adulteration in processed foods. Western blotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed that the pAb exhibited strong specificity toward multiple shrimp species (*Penaeus japonicus, Metapenaeus joyneri, Penaeus chinensis, Pandalus borealis,* and *Penaeus monodon*) without detectable cross-reactivity to non-shrimp food matrices. The pAb-based indirect ELISA detected shrimp percentages in the range of 100% (w/w) to 0.001% (w/w). TSSPs maintained their antigenicity after heat treatments (steaming at 100°C for 60 min, frying at 170°C for 8 min, and sterilization at 121°C for 60 min), making them reliable biomarkers for shrimp detection in processed foods. Overall, the developed polyclonal antibody could serve as a reliable bio-recognition element for immunoassays or biosensors aimed at detecting shrimp-derived allergens in heat-processed and commercially prepared food products.

Key words: Shrimp, Thermal-stable soluble protein, Biomarkers, Polyclonal antibody, Indirect ELISA

식품 알레르기는 전 세계 인구의 약 10%에 영향을 미치는 주요 공중 보건 문제로, 특정 항원을 함유한 식품 섭취나 접촉 시 인체 면역체계가 과도하게 반응하여 발생한다. 이로 인한 알레르기 반응은 두드러기, 혈관부종, 호흡곤란, 심한 경우 아나필락시스 등으로 나타나며, 즉시형 반응뿐 아니라 1-2일 후에 발생하는 지연형 반응도 보고되고 있다[1,2].

수산물은 단백질, 비타민, 무기질 등 다양한 영양성분을 함유하고 있으며, 기후 변화에 비교적 영향을 적게 받으면서 수요가 지속적으로 증가하고 있다[3]. 그러나 일부 수산물은 강한 알레르기 유발성을 지니고 있어 식품 안전 관리 측면에서 주의가 필요하다. 특히 새우는 풍부한 영양성분과 다양한 조리 활용성으로 인해 세계적으로 소비량이 꾸준히 증가하고 있다. 미국 국립수산연구소(National Fisheries Institute, NFI)의 보고에 따르면 2021년 새우 1인당 소비량이 5.9 파운드로 2020년 5.0 파운드에서 증가하였으며, 국내에서도

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

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2006년 661톤이던 새우 생산량이 2022년에는 9,504톤으로 약 14배 증가하였다[4]. 이러한 소비 증가는 새우 알레르기 발생 위험을 높일 수 있다[5-7]. 2023년 한국소비자원 조사에 따르면, 시중 판매되는 조미소금에서 알레르기 유발 물질인 새우 성분이 표시되지 않은 사례가 확인되어 판매 차단 조치가 내려졌다[8]. 우리나라 「식품 등의 표시·광고에 관한 법률 시행규칙」 [별표 2]에서는 새우를 포함한 19종의 알레르기 유발 식품을 사용 또는 함유한 경우, 반드시 눈에 띄게 바탕색과 구분되는 색상으로 표시하도록 규정하고 있다[9]. 그러나 여전히 가공식품 내 새우 혼입 여부를 확인하는 신뢰성 높은 분석법은 제한적이다.

식품 알레르겐 검출에는 액체크로마토그래피–질량분석법(liquid chromatography - mass spectrometry, LC/MS), real-time PCR (RT-PCR), 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 등이 사용된다. 현재까지 DNA 기반 고민감도 RT-PCR은 높은 민감도를 보이나 숙련된 실험자와 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있다[10]. 반면, 간편하고 신속한 분석이 가능한 ELISA법은 식품 산업에서 의도적 또는 비의도적으로 함유된 알레르겐을 검출하고 정량화하는 데 널리 사용되고 있다[11]. 그러나 고압 멸균, 살균, 가열, 증기처리 등 일반적인 열처리 과정에서 식품 알레르겐의 항원성이 감소하는 문제는 여전히 면역분석법 개발의 중요한 과제로 남아 있다[12].

새우는 대부분 가열 가공 후 소비되므로, 이러한 공정에서도 항원성을 유지하는 열안정성 수용성 단백질(thermal stable-soluble proteins, TSSP)은 가공식품 내 새우 검출을 위한 바이오마커로서 이상적인 접근법으로 여겨진다. 그러나 현재까지 양식 산업에서는 집단 폐사의 원인인 세균·바이러스 진단용 면역분석법이 연구되어 있는 반면, 가공식품 내 새우 혼입 유무를 확인할 수 있는 항체 개발 및 면역분석법의 개발은 아직 미흡한 실정이다[13]. 따라서 본 연구에서는 새우에서 thermal-stable soluble protein (TSSP)를 분리·확인하고 이를 면역원으로 사용하여 다클론성(polyclonal) 항체를 생산하였다. 또한 이 항체를 기반으로 가공식품 내 새우 혼입 여부를 신속하게 확인할 수 있는 간접 효소면역분석법을 개발하고, 열처리에 따른 TSSP의 항원성 변화를 관찰하였다.

Materials and Methods

재료 및 시약

본 실험에 사용된 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 경상남도 진주에 위치한 대형마트에서 판매하고 있는 새우를 구입하였으며, 생새우, 삶은 새우(100°C, 15 min), 튀긴 새우(170°C, 2 min), 고압멸균 새우 (121°C, 15 min)를 준비하여 실험에 이용하였다. 또한, 항체의 특이성을 확인하기 위해 중하(*Metapenaeus joyneri*), 대하(*Penaeus chinensis*), 북쪽분홍새우(*Pandalus borealis*), 블랙타이거새우(*Penaeus monodon*) 및 알레르기를 유발할 수 있는 수산물(바닷가재, 문어, 명태)과 기타 식품 알레르겐(꽃게, 오징어, 고등어, 홍합, 전복, 가리비, 바지락, 우유, 밀가루, 난백, 참깨, 대두, 돼지고기, 닭고기, 소고기) 총 23점은 경상남도 진주 지역의 대형마트 또는 온라인 쇼핑몰을 통해 구입하여 실험에 사용하였다. 흰다리새우로부터 TSSP 추출을 위해 5종의 버퍼(0.5 M sodium chloride (NaCl, pH 6.5), 0.01 M carbonate buffer (pH 9.6), 0.025 M Tris-buffered saline (TBS; pH 7.4), 0.02 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.05 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4))를 준비하였으며, 여과지(Whatman NO. 4, Buckinghamshire, UK)를 사용해 여과하였다. Quick Start™ Bradford Protein Assay Dye, AP conjugate substrate kit는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA), ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], Tween 20는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase (HRP) conjugate와 pAb-mouse IgG AP (Alkaline Phosphatase)는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였고, skim milk는 GeorgiaChem (Hebei, China)에서 구입하였다.

새우의 TSSP 추출 및 확인

추출 버퍼의 종류에 따라 시료로부터 추출되는 TSSP 농도와 그 패턴을 비교하기 위해 다진 고압멸균 흰다리새우를 3 g씩 취해 27 mL의 5종의 추출 버퍼(0.05 M PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4), 0.01 M carbonate (pH 9.6), 0.5 M NaCl (pH 6.5), 0.025M TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7.4), 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 6.8))를 각각 첨가하고 30초 동안 균질화하였다. 균질화된 시료는 100°C 끓는 물에서 15분 동안 가열하여 추출하였으며[14], 각 추출액은 50 mL의 conical tube로 옮겨 3,200×g에서 10분간 원심분리 후 여과지를 이용해 여과하여 실험에 사용하였다. 각 추출액 중 TSSP 확인은 Laemmli의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분석하였다[15]. 먼저 5%의 stacking gel과 12%의 separating gel을 준비하고, 고압가열한 각각의 흰다리새우 추출액을 실험실에서 제조한 5×SDS sample buffer와 1 : 4 (v/v)로 혼합한 뒤, 끓는 물에서 5분간 열처리하였다. 이후 stacking gel의 각 comb에 7 μL씩 분주하고 전기영동장치(Bio-Rad)를 사용해 150 V에서 60분간 전기영동하였다. 5종의 추출 버퍼별 단백질 추출 효율은 Quick start™ Bradford Protein Assay Dye (Bio-Rad)를 이용해 단백질 정량으로 확인하였다.

새우 TSSP에 대한 다클론성 항체(polyclonal antibody; pAb) 생산

본 연구에 사용된 동물실험은 경상국립대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: GNU-240226-M0043)을 받아 수행하였다. 새우의 TSSP에 대한 pAb를 생산하기 위해 암컷 3-4주령 BALB/c 마우스(Hyochang Science, Daegu, Korea) 2마리에 0.05 M PBS로 추출한 고압멸균 흰다리새우 추출액을 항원으로 사용하였다. Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich)

와 1:1로 유화하여 한 마리당 200 μL씩 2주 간격으로 4차례 면역을 실시하였다. 1차 면역은 complete Freund's adjuvant를 이용하여 면역을 실시하였으며, 2, 3차 면역은 incomplete Freund's adjuvant를 이용하여 면역을 실시하였다. 3차 접종 3일 후 마우스의 꼬리 부분에서 혈액을 채취하여 indirect ELISA로 항체 형성 여부를 확인하였고, 이후 항원만 200 μL씩 주사하여 4차 면역을 실시하였다. 4차 면역 후에는 심장 채혈법을 통해 혈액을 채취하였으며, 혈액은 4°C에서 6,400×g (Hanil Combi-514R, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Gimpo, Korea)로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 다클론 항체로 사용하였다.

면역한 마우스에 대한 항체생성 여부는 꼬리 정맥에서 1 μL의 혈액을 채취하여 indirect ELISA로 확인하였다. 간략히 설명하면, 0.05 M PBS (pH 7.4)로 추출한 고압가열 흰다리새우 추출액을 96 well microplate (SPL life sciences, Pocheon, Korea)의 well에 각 100 μL씩 분주하고, 37°C에서 1시간 coating 후 PBST로 3회 세척하였다. 1% skim milk로 blocking (200 μL/well) 후 PBST로 4회 세척하였고, 혈액을 0.05 M PBS로 500, 1,000, 5,000, 10,000, 20,000, 40,000, 80,000배 희석하여 100 μL씩 분주하고 37°C에서 1시간 반응 후 5회 세척하였다. PBS로 10,000배 희석한 goat anti-mouse IgG HRP conjugate를 well에 각각 100 μL씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시키고 PBST로 6회 세척하여 발색제가 첨가된 ABTS 기질용액을 100 μL/well씩 넣어 37°C에서 30분 반응시킨 후 Microplate reader (Tecan, Durham, NC, USA)로 흡광도를 405 nm에서 측정하였다[16].

새우 혼입 검출을 위한 indirect ELISA 개발과 TSSP의 pAb에 대한 특성확인

생산된 pAb를 이용하여 새우 혼입을 신속하게 검출할 수 있는 indirect ELISA법을 최적화하였다. 최적화를 위해 coating 온도(4°C, 37°C)와 시간(1시간, overnight), blocking 시약인 skim milk 농도(0.1, 0.3, 0.5, 1%), pAb의 희석배수(1:1,000, 1:3,000, 1:5,000), 기질인 ABTS 내 H_2O_2의 첨가량(3.5, 7, 10 μL/10 mL)의 조건을 확인하였다. 최적화에 사용된 추출액의 농도는 0.1, 0.03, 0.001, 0.003, 0.0001, 0%로 사용하였고, 각 결과에서 민감도가 가장 높은 조건을 최종 선정하였다.

생산된 pAb 특성 확인은 새우 5종(whiteleg shrimp, shiba shrimp, fleshy prawn, Arctic prawn, black tiger prawn)과 알레르기를 유발하는 또는 유발할 가능성이 있는 식품 18종(lobster, crab, octopus, squid, frozen pollock, mackerel, scallop, manila clam, mussel, abalone, milk, wheat flour, egg white, sesame, soybean, pork, chicken, beef)을 포함해 총 23점의 시료를 대상으로 indirect ELISA와 western blot으로 분석하였다. Indirect ELISA는 TSSP 추출과 동일한 방법으로 0.05 M PBS (pH 7.4)로 0.1 mg/mL로 조정 후, 96 well microplate (SPL Life Sciences Co., Ltd.)의 well에 100 μL씩 분주하였다. 37°C에서 1시간 반응 후, pAb의 희석배수(1:5,000)를 사용한 것을 제외하고는 항혈청 역가 측정 시의 indirect ELISA법과 동일하게 진행하였다. Western blot은 SDS-PAGE 후, 350 mA에서 1시간 동안 PVDF membrane (Sigma-Aldrich)에 단백질을 transfer하였다. PVDF membrane을 TBS-0.05% Tween 20 (TBST)로 3회 세척하고, 3% skim milk로 4°C에서 overnight blocking 후 PBST로 4회 세척하였다. pAb는 3% skim milk에 1:1,000으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응 후 5회 세척하였고, goat anti-mouse AP conjugate를 3% skim milk로 1:5,000으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 마지막으로 PBST로 6회 세척한 후, AP conjugate substrate kit를 사용하여 결과를 확인하였다.

가열방법 및 시간에 따른 TSSP 항원성의 변화

새우 내 존재하는 TSSP가 일반적인 열처리 방법인 삶음(100°C, 0-60분), 멸균(121°C, 0-60분), 그리고 튀김(170°C, 0-8분) 방법에 대한 항원성 유지 정도를 indirect ELISA로 확인하였다. 열처리된 각각의 새우는 잘게 다진 후 앞서 TSSP를 추출한 방법과 동일하게 추출하였으며, 이를 coating 단계에서 사용하여 indirect ELISA로 분석하였다[17,18].

Results and Discussion

새우 중 TSSP의 확인

새우 중 TSSP 확인을 위해 고압멸균법으로 처리된 흰다리새우를 단백질 추출에 주로 사용되는 5종의 버퍼를 이용

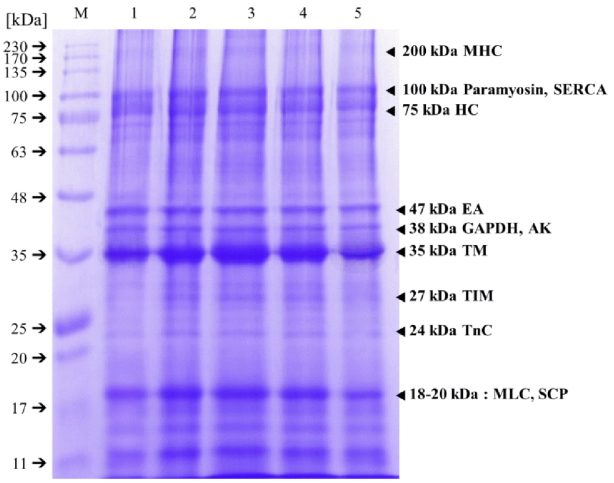

Fig. 1. SDS-PAGE patterns of shrimp protein extracts using five different extraction buffers.
M: marker; 1: 0.5 M NaCl (pH 6.5); 2: 0.01 M carbonate buffer (pH 9.6); 3: 0.025 M TBS (pH 7.4); 4: 0.02 M Tris-HCl (pH 6.8); 5: 0.05 M PBS (pH 7.4) ; MHC, myosin heavy chain; SERCA, smooth endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase; HC, hemocyanin; EA, enolase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; AK, arginine kinase; TM, tropomyosin; TIM, triose phosphate isomerase; TnC, troponin C; MLC, myosin light chain; SCP, sarcoplasmic calcium-binding protein.

Table 1. Protein concentration of sterilized shrimp protein extracts using five different buffers

Method	Extraction buffer	Protein concentration (mg/mL)
Heating	0.5 M Sodium chloride (pH 6.5)	3.86±0.02[b]
	0.01 M Carbonate buffer (pH 9.6)	4.41±0.03[a]
	0.02 M Tris-HCl (pH 6.8)	3.47±0.03[c]
	0.05 M Phosphate-buffered saline (pH 7.4, PBS)	3.91±0.02[b]
	0.025 M Tris-buffered saline (pH 7.4, TBS)	3.84±0.02[b]

Data are presented as mean±standard deviation (n=3). Different superscript letters indicate significant differences between extraction buffers (P<0.005).

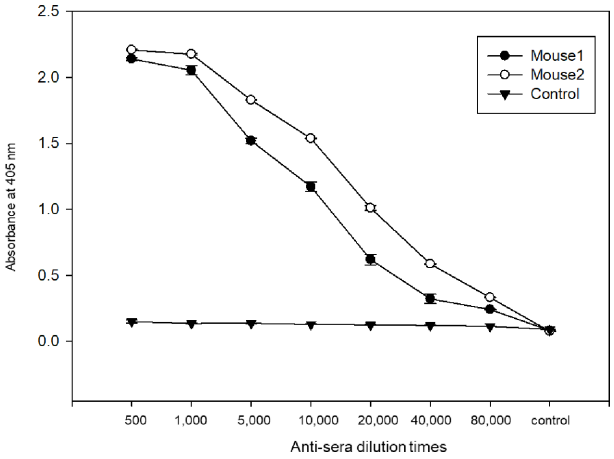

Fig. 2. Anti-sera titration of immunized mice against shrimp TSSP by indirect ELISA. Mouse 1 and 2 were immunized with shrimp TSSP; control mouse was not immunized.

하여 단백질추출을 실시하였고, 추출효율을 비교하였다[19]. SDS-PAGE를 통해 단백질 추출 패턴을 확인한 결과, 버퍼에 따른 추출 패턴의 차이는 없었고, 모든 버퍼에서 약 200 kDa 부근의 myosin heavy chain (MHC), 100 kDa 부근의 paramyosin 및 smooth endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), 75 kDa 부근의 hemocyanin (HC), 47 kDa의 enolase (EA), 38-40 kDa 부근의 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)와 arginine kinase (AK), 35 kDa의 tropomyosin (TM), 27 kDa의 triose phosphate isomerase (TIM), 24 kDa의 troponin C (TnC), 18-20 kDa 부근의 myosin light chain (MLC)과 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) 등의 밴드가 관찰되었다(Fig. 1)[20-28]. Tropomyosin (TM, Lit v 1), arginine kinase (AK, Lit v 2), myosin light chain (MLC, Lit v 3), sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP, Lit v 4)은 WHO/IUIS에 등록된 공식 새우 알레르겐으로, 열처리에도 안정한 특성을 보여 알레르기 반응의 주요 원인으로 알려져 있다[24,25,28]. Hemocyanin, enolase, GAPDH, paramyosin, TIM, TnC 등은 여러 연구에서 IgE 결합성이 보고된 알레르겐이며, 특히 tropomyosin, arginine kinase, MLC, SCP는 가열 후에도 뚜렷이 검출되어 열안정성이 높은 알레르겐임을 확인할 수 있었다[20-23,26,27]. 전기영동 결과로, 새우의 알레르기를 일으키는 단백질은 대부분 열에 안정한 수용성 단백질로 확인되었다. 5종의 추출 버퍼에서 단백질 농도는 protein assay로 확인하였으며, Table 1에서 보는 바와 같이 0.01 M carbonate buffer가 4.4 mg/mL로 가장 높은 효율을 보였고, 0.02 M Tris-HCl 버퍼에서 가장 낮은 효율이 나타냈다[30]. PBS는 3.91 mg/mL로 0.01 M carbonate buffer보다 다소 낮은 추출을 보였으나 ELISA법에서 주로 사용되고, pH 조절이 용이하며 단백질 추출에 필요한 기본적인 조건을 제공하기 때문에 이후 실험에서는 0.05M PBS를 이용한 TSSP 추출액을 사용하였다.

다클론성 항체 생산 및 반응성 확인

새우 TSSP를 면역시킨 마우스의 항체 생성 여부를 확인하기 위해, 3차 면역 후 indirect ELISA로 항혈청 역가를 측정한 결과, 면역한 마우스 두 마리 모두 새우 TSSP에 대한 항체가 생성됨을 확인하였다. 이후 항원 2배량을 주사하여 4차 면역을 진행하였고, 4일 후 심장에서 채혈 후 안락사시킨 뒤 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 pAb로 사용하였다. 생산된 다클론성 항체의 교차반응성을 확인하기 위해 새우 5종과 알레르기 유발할 가능성이 있는 수산물(바닷가재, 문어, 명태) 그리고 식품 알레르겐(꽃게, 오징어, 고등어, 홍합, 전복, 가리비, 바지락, 우유, 밀가루, 난백, 참깨, 대두, 돼지고기, 닭고기, 소고기) 추출물을 대상으로 시험하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 indirect ELISA에서는 새우 추출물(1-5번)에서만 흡광도가 2.0 이상으로 강한 반응이 나타났으며, 기타 추출물(6-23번)은 0.5 이하로 반응이 거의 없었다. Western blot 분석에서도 반응은 5종의 새우 추출물에서만 특이적 밴드가 관찰되었으며, 주요 밴드는 약 35-38 kDa (tropomyosin) 및 약 75 kDa (hemocyanin) 부근에서 확인되었다. 이러한 결과는 생산된 pAb가 새우 TSSP에 높은 특이성과 선택성을 가지며, 가공식품 중 새우 혼입 여부 검출에 활용 가능함을 보여준다.

새우 혼입 검출을 위한 indirect ELISA 개발

가공식품 중 새우 혼입 여부를 신속히 측정할 수 있는 indirect ELISA를 개발하기 위해 코팅, 블로킹, 1차 항체의 반응조건을 최적화하였다. 농도별(0, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1%)로 코팅한 흰다리새우 추출액을 37°C, 1시간 또는 4°C overnight 조건에서 반응시킨 후, 민감도가 높은 조건을 선정하였다. Indirect ELISA를 실시한 결과, Fig. 4A와 같이 37°C에서 overnight 반응시킨 조건을 제외한 모든 조건에서 새우 혼입 0.1%까지 검출 가능함을 확인하였다. 비특이적인

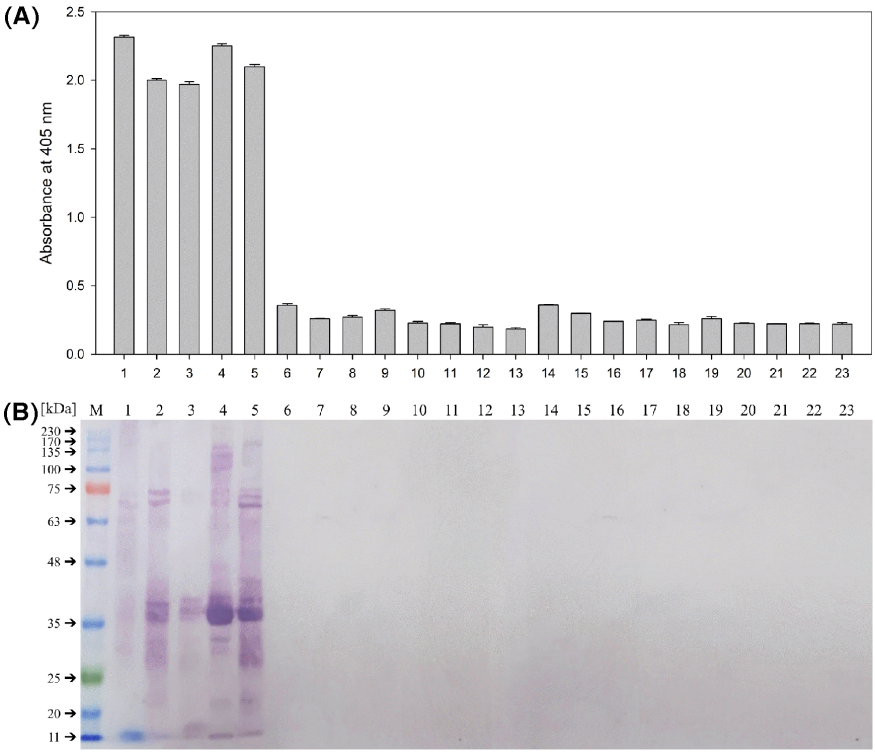

Fig. 3. Cross-reactivity of the developed polyclonal antibody against shrimp TSSP evaluated by indirect ELISA (A) and Western blot (B). Tested samples (1-23); 1: whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), 2: shiba shrimp (*Metapenaeus joyneri*), 3: fleshy prawn (*Penaeus chinensis*), 4: northern shrimp (*Pandalus borealis*), 5: black tiger prawn (*Penaeus monodon*), 6: lobster, 7: crab, 8: octopus, 9: squid, 10: frozen pollock, 11: mackerel, 12: scallop, 13: manila clam, 14: mussel, 15: abalone, 16: milk, 17: wheat flour, 18: egg white, 19: sesame, 20: soybean, 21: pork, 22: chicken, 23: beef.

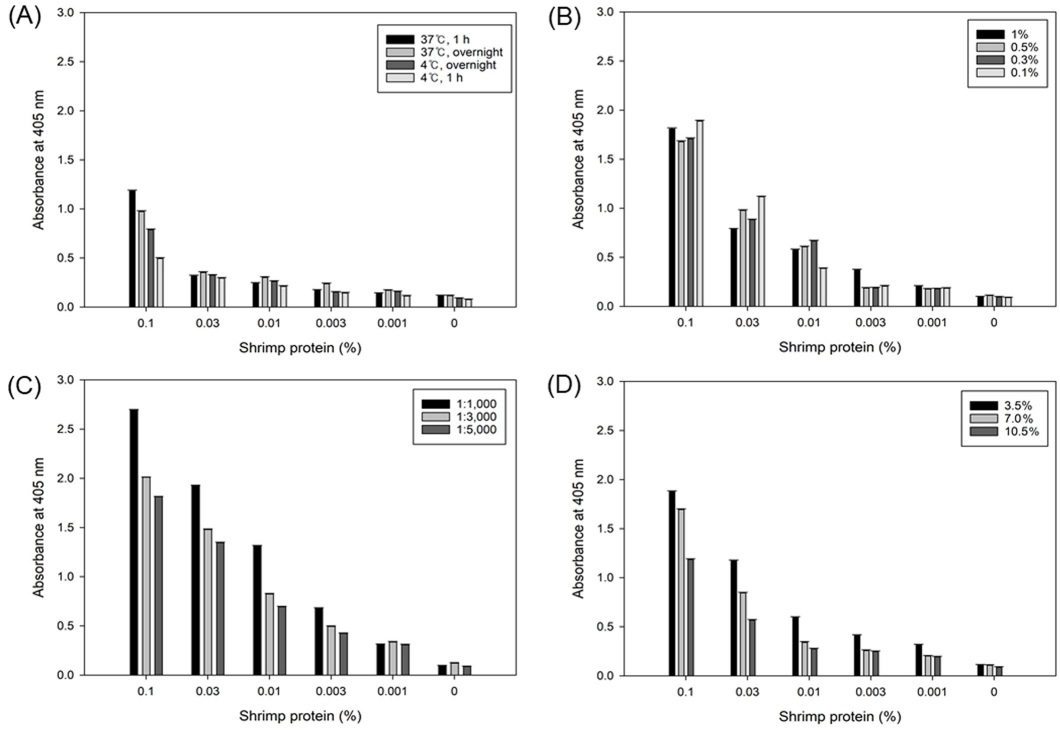

Fig. 4. Optimization of experimental conditions for developing a highly sensitive indirect ELISA using the developed polyclonal antibody against shrimp TSSP (P<0.005). (A) Coating temperature and time; (B) Blocking reagent concentrations and time (1 h); (C) Primary antibody dilutions and incubation time (1 h); (D) Substrate reaction with various volumes of H_2O_2 (30 min).

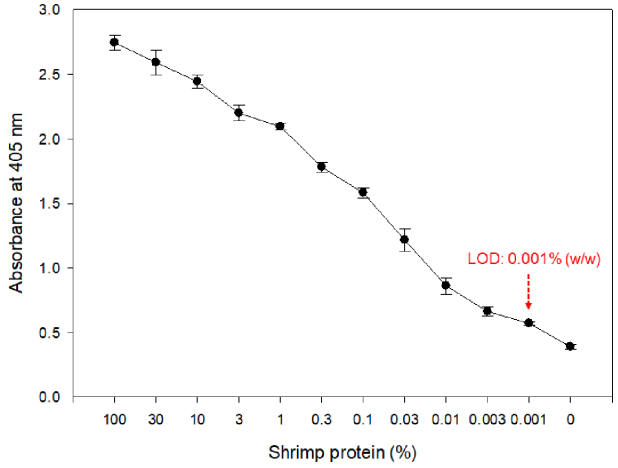

Fig. 5. Standard curve of indirect ELISA for shrimp TSSP using the developed polyclonal antibody; data are expressed as mean±SD (n=3).

반응을 효과적으로 제거하기 위한 최적의 blocking 조건 확립을 위하여 0.1, 0.3, 0.5 및 1% skim milk용액을 사용하여 indirect ELISA를 실시한 결과, 새우 함유량 0% 조건에서 흡광도 값이 0.10-0.12 범위로 나타나 모든 조건에서 비특이적인 반응을 효과적으로 제거해 주는 것을 확인하였다. 이 중 1% skim milk 용액을 사용하였을 때, 비특이적인 반응은 낮으면서 새우 혼입율 0.001% 조건에서 가장 높은 흡광도(0.21)가 확인되어 이를 선정하였다(Fig. 4B). 또한, blocking의 온도와 시간에 따른 반응성을 확인한 결과, 모든 조건에서 유사한 결과를 보였기 때문에 반응시간을 단축할 수 있는 37°C, 1시간 조건을 선택하였다. pAb 항체의 농도는 새우 0.001% (0.34)와 0% (0.12)에서 흡광도가 가장 큰 3,000배를 희석배수로 선정하였다(Fig. 4C). 마지막으로, 기질 발색 단계에서 기질 10 mL당 H_2O_2의 첨가량에 따른 민감도를 확인한 결과, Fig. 4D와 같이 3.5 µL를 첨가한 용액을 30분 동안 반응시켰을 때 0.001% (0.32)과 0% (0.11)에서 흡광도의 가장 큰 차이를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 종합하면, 최적의 indirect ELISA 조건으로 코팅은 4°C, overnight, 블로킹은 1% skim milk를 37°C, 1시간, 새우 pAb는 3,000배로 37°C, 1시간, 기질반응조건은 기질 10 mL당 H_2O_2 3.5 µL를 첨가하는 조건으로 결정되었다. 최적화된 indirect ELISA의 검출한계(limit of detection, LOD)는 0.001% (w/w; 10 µg/mL)로, 0% 흡광도 평균+(0% 흡광도 표준 편차×3) 기준으로 산정하였다(Fig. 5). Do 등[30]이 보고한 민감도 10 µg/mL의 sandwich ELISA법과 동일한 민감도의 indirect ELISA법으로 확인되었으며, 단일항체를 사용하기 때문에 기존 sandwich ELISA법보다 경제성이 높은 분석법으로 확인되었다.

열처리 방법 및 시간에 따른 새우 내 TSSP의 항원성 변화

일반적으로 단백질은 열에 민감해 변성되어 항원성을 잃게 되는 경우가 많다[31]. 본 연구에서는 새우를 삶음(100°C, 0-60분), 멸균(121°C, 0-60분), 그리고 튀김(170°C, 0-8분) 처리 후 항원성 변화를 확인하였다. 삶음(흡광도 2.84-3.02)과 멸균(흡광도 2.69-3.02) 조건에서는 60분까지 항원성이 유지되었으나 이후 감소하였다(Fig. 6). 특히 90분 시점에서 흡광도(삶음 : 1.6, 멸균: 1.4)가 급격히 낮아졌으며, 이를 항원성 유지의 기준값으로 설정할 수 있다. 해당 값 이상에서는 항원성이 유지

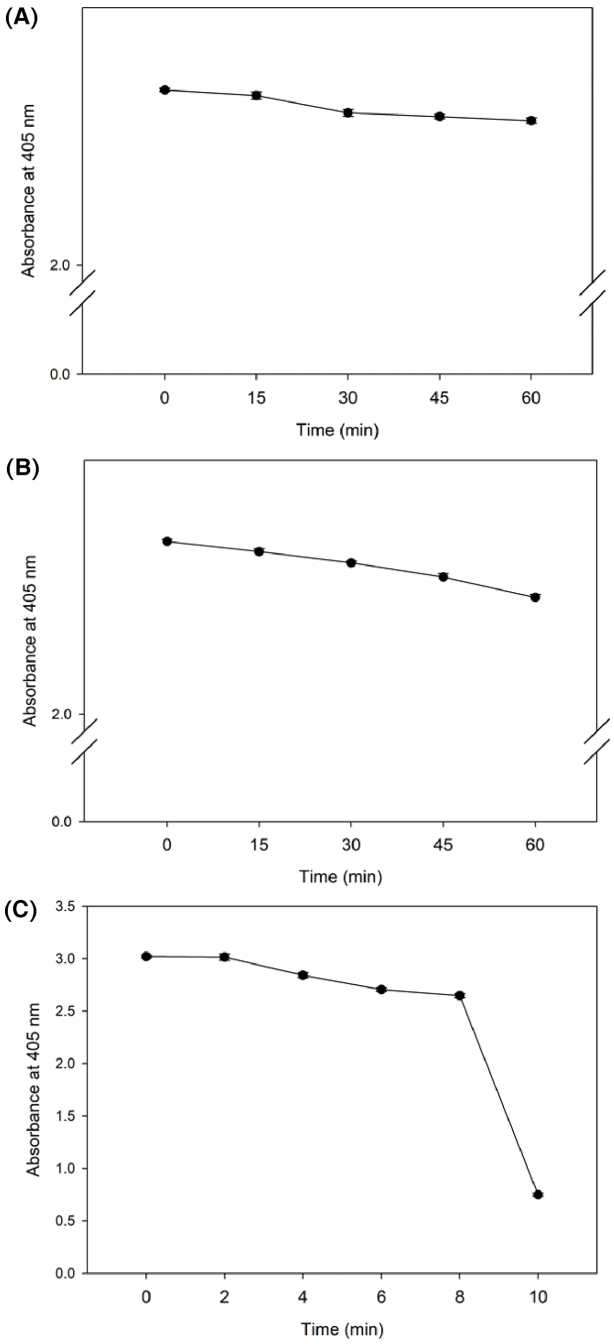

Fig. 6. Changes in antigenicity of shrimp TSSP following different heat treatments by indirect ELISA. (A): Boiling, (B): Autoclaving, (C): Frying.

되는 것으로 간주된다. 튀김의 경우 8분까지는 흡광도 2.6 이상으로 일부 항원성이 유지되었으나, 이후에는 검게 타면서 항원성과 상품성이 모두 소실되었다. 열처리 후에도 일부 단백질이 항원성을 유지하는 것을 확인하였으며, 이를 활용하면 가공식품 중 대상 식품의 혼입 여부를 확인할 수 있는 바이오마커로 이용 가능할 것으로 판단되었다[32,33].

본 연구에서 개발한 다클론성 항체는 다른 식품 알레르겐과 교차반응 없이 새우에만 특이적으로 반응하였으며, 최적화된 indirect ELISA는 삶은(100°C), 고압가열(121°C) 처리된 조건에서 최대 60분까지 검출가능한 것으로 확인되었다. 따라서 새우 TSSP는 가공식품 중 새우의 혼입여부를 판정하는 바이오마커로 이용 가능할 것이며, TSSP 기반 다클론성 항체는 가공식품 중 혼입된 새우를 검출하는 도구로 활용이 가능할 것으로 예상된다.

Acknowledgement

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(NRF-2022R1F1A1076121)을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

새우는 지질과 칼로리가 낮은 고단백질 공급원으로, 분말 또는 소스 형태로 가공되어 다양한 식품에 첨가된다. 그러나 새우 알레르기가 있는 환자가 섭취할 경우 심각한 건강상의 위험을 초래할 수 있으며, 특히 가공식품에 포함된 알레르기 유발물질은 인지하고 섭취를 피하기 어렵다. 이에 따라 가공식품 중 새우를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 분석법 개발이 요구된다. 본 연구에서는 새우의 열안정성 수용성 단백질(TSSP)의 존재를 확인하고, 이를 이용하여 생산한 다클론성 항체(pAb)를 기반으로 간접 효소결합면역흡착분석법(indirect ELISA)을 개발하였다. 생산된 pAb는 *Penaeus japonicus, Metapenaeus joyneri, Penaeus chinensis, Pandalus borealis, Penaeus monodon* 등 5종의 새우에만 특이적으로 반응하였으며, 다른 식품 성분과 교차 반응을 보이지 않았다. 개발된 pAb 기반 indirect ELISA의 검출한계(LOD)는 0.001%였다. 또한 삶음(100°C, 60분), 멸균(121°C, 60분), 튀김(170°C, 8분) 처리된 새우 시료에서도 검출이 가능하여, 다양한 조리 조건 적용 후에도 검출이 가능함을 확인하였다. 이러한 결과는 새우 TSSP가 열처리 식품에서 새우 혼입 여부를 식별할 수 있는 항원 및 바이오마커로 활용될 수 있음을 시사한다. 더 나아가, 본 연구에서 개발된 pAb는 가공식품에 혼입된 새우 검출을 위한 면역분석 및 바이오센서 개발에 유용한 생체수용체로 활용될 수 있다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Song-Min Lee https://orcid.org/0000-0003-0527-6332
Hye-Jin Kim https://orcid.org/0009-0005-4147-6691
Sol-A Kim https://orcid.org/0000-0002-4055-7511
Jeong-Eun Lee https://orcid.org/0000-0002-0790-8578
Hee-Kyeong Yang https://orcid.org/0009-0006-1139-502X
Won-Bo Shim https://orcid.org/0000-0003-1800-6091

References

1. Bartha, I., Almulhem, N., Santos, A.F., Feast for thought: a comprehensive review of food allergy 2021-2023. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **153**, 576-594 (2024).
2. Food and Agriculture Organization (FAO), 2022. The state of world fisheries and aquaculture 2022: towards blue transformation. FAO, Rome, Italy, pp. 1-266.
3. Nesara, K.M., Paturi, A.P., Nutritional requirement of freshwater prawn and shrimps: a review. *J. Entomol. Zool. Stud.*, **6**, 1526-1532 (2018).
4. National Fisheries Institute (NFI), (2024, May 3). Top 10 Lists for Seafood Consumption (U.S. per capita; Shrimp 5.9 lb in 2021, up from 5.0 lb in 2020). Retrieved from https://aboutseafood.com/education-resources/top-10-lists-for-seafood-consumption
5. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2024, April 4). Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2017-15. Retrieved from https://www.mfds.go.kr/index.do?mid=686&pageNo=1&seq=11721
6. Lee, Y.K., (2023, October 30). White-legged shrimp turns into a domestic shrimp... You are being deceived. Retrieved from https://daily.hankooki.com/news/articleView.html?idxno=568212
7. Kwon, O.C., (2023, October 30). Domino's pizza 'controversial' by turning cheap king prawn shrimp into black tiger shrimp. Retrieved from https://www.ohmynews.com/NWS_Web/View/at_pg.aspx?CNTN_CD=A0002533087
8. Flegel, T.W., A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *J. World Aquac. Soc.*, **50**, 249-266 (2019).
9. Nurilmala, M., Ajitama, Y., Jacoeb, A.M., Indarwati, A.R., Nugraha, R., Advancing traceability using DNA sequence on seafood product: fraudulence in shrimp crackers. *Biodiversitas*, **21**, 5627-5633 (2020).
10. Kim, M.J., Park, S.B., Kang, H.B., Lee, K.M., Kim, H.Y., Development of ultrafast PCR for rapid detection of buckwheat allergen DNA (fage 1) in processed foods. *Food Control*, **130**, 108334 (2021).
11. Pandey, A.K., Varshney, R.K., Sudini, H.K., Pandey, M.K., An improved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based protocol using seeds for detection of five major peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, and Ara h 8. *Front. Nutr.*, **6**, 68 (2019).
12. Saptarshi, S.R., Sharp, M.F., Kamath, S.D., Lopata, A.L., Antibody reactivity to the major fish allergen parvalbumin is determined by isoforms and impact of thermal processing. *Food Chem.*, **148**, 321-328 (2014).

13. Lawrence, S., Elliott, C., Huisman, W., Dean, M., Ruth, S., The 11 sins of seafood: assessing a decade of food fraud reports in the global supply chain. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **21**, 3746-3769 (2022).
14. Kim, S.A., Toushik, S.H., Lee, J.E., Shim, W.B., Ultrasensitive monoclonal antibodies specific to thermal stable-soluble proteins of buckwheat. *Food Chem.*, **423**, Article 136269 (2023).
15. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
16. 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**, 75-81 (2017).
17. Bloom, K.A., Huang, F.R., Bencharitiwong, R., Bardina, L., Ross, A., Sampson, H.A., Nowak-Wegrzyn, A., Effect of heat treatment on milk and egg proteins allergenicity. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **25**, 740-746 (2014).
18. Cabanillas, B., Jappe, U., Novak, N., Allergy to peanut, soybean, and other legumes: recent advances in allergen characterization, stability to processing and IgE cross-reactivity. *Mol. Nutr. Food Res.*, **62**, 1700446 (2018).
19. Kim, S.A., Production of monoclonal antibodies specific to thermal stable-soluble protein in peanut and their application to development of an indirect ELISA method. Master's thesis, Gyeongsang National University, Jinju, Korea (2019).
20. Suzuki, M., Kobayashi, Y., Hiraki, Y., Nakata, H., Shiomi, K., Paramyosin of the disc abalone: identification as a new allergen and cross-reactivity with tropomyosin. *Food Chem.*, **124**, 921-926 (2011).
21. Chuang, J.G., Su, S.N., Chiang, B.L., Lee, H.J., Chow, L.P., Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) hemolymph: identification of hemocyanin as a new allergen. *Proteomics*, **10**, 3660-3671 (2010).
22. Sahabudin, S., Misnan, R., Mohammad Yadzir, Z.H., Mohamad, J., Abdullah, N., Bakhtiar, F., Murad, S., Identification of major and minor allergens of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) and king prawn (*Penaeus latisulcatus*). *Malays. J. Med. Sci.*, **18**, 27-32 (2011).
23. Khanaruksombat, S., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P., Phiriyangkul, P., Identification of a novel allergen from muscle and various organs in banana shrimp (Fenneropenaeus merguiensis). *Ann. Allergy Asthma Immunol*., **113**, 301-306 (2014).
24. Ayuso, R., Grishina, G., Ibáñez, M.D., Blanco, C., Carrillo, T., Bencharitiwong, R., Sánchez, S., Nowak-Wegrzyn, A., Sampson, H.A., Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **124**, 114-120 (2009).
25. Ayuso, R., Reese, G., Leong-Kee, S.M., Plante, M., Lehrer, S.B., Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **129**, 38-48 (2002).
26. Yu, C.J., Lin, Y.F., Chiang, B.L., Chow, L.P., Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J. Immunol*., **170**, 445-453 (2003).
27. Liu, K., Lin, S., Gao, X., Wang, S., Liu, Y., Liu, Q., Sun, N., Reduced allergenicity of shrimp (*Penaeus vannamei*) by altering the protein fold, digestion susceptibility, and allergen epitopes. *J. Agric. Food Chem*., **71**, 9120-9134 (2023).
28. Ayuso, R., Grishina, G., Bardina, L., Carrillo, T., Blanco, C., Ibáñez, M.D., Sampson, H.A., Beyer, K., Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **122**, 795-802 (2008).
29. Faisal, M., Vasiljevic, T., Donkor, O.N., Effects of selected processing treatments on antigenicity of banana prawn (*Fenneropenaeus merguiensis*) tropomyosin. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **54**, 183-193 (2019).
30. Do, J.R., Back, S.Y., Shon, D.H., Development of sandwich ELISA for thedetection of shrimp in processed foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **46**, 538-543 (2014).
31. Koo, S.Y., Cha, K.H., Lee, D.U., Effects of high hydrostatic pressure on foods and biological system. *Food Sci. Ind.*, **40**, 23-30 (2007).
32. Kwak, J.H., Kim, K.B.W.R., Lee, C.J., Kim, M.J., Kim, D.H., SunWoo, C., Jung, S.A., Kang, J.Y., Kim, H.J., Choi, J.S., Kim, S.W., Ahn, D.H., Changes in antigenicity of gliadin from medium flour by autoclave and microwave treatments. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**, 1423-1429 (2011).
33. Wijayanti, H.B., Bansal, N., Deeth, H.C., Stability of whey proteins during thermal processing: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **13**, 1235-1251 (2014).