유전자 분석법을 이용한 알레르기 유발물질 판별법

Detection Methods for Allergy Inducing Materials Using Gene Analysis

서승만, 김희인, 박샛별, 김해영*

Seung-Man Suh, Hee-In Kim, Saet-Byul Park, Hae-Yeong Kim

경희대학교 생명과학대학 식품생명공학과

Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee university

1. 서론

식품알레르기는 우리 몸의 면역체계가 특정 식품의 단백질을 항원으로 인식하여 과도한 항원항체 반응을 유발하는 것을 말한다(1). 전체 인구수 중에 약 4%가 식품에 알레르기 반응을 일으키는 것으로 보고된 바 있으며, 면역력이 약한 영 · 유아에게서 높은 발병률을 보인다(2). 식품알레르기로 인해 발생하는 증상으로는 복통, 구토, 설사 등의 위장관 반응, 기침, 콧물, 천식 등의 호흡기 반응, 두드러기, 아토피 피부염 같은 피부 반응 등 경미한 경우가 대부분이지만 환자의 생명을 위협할 수 있는 경련, 저혈압 등이 동반되는 아나팔락시스(anaphylaxis, 알레르기 쇼크)와 같은 증상도 보고되고 있다(3).

국가별로 고유의 식문화 및 인종에 따라 알레르기를 유발하는 식품군들이 다르기 때문에 의무적으로 표시하여야 하는 알레르기 유발 물질 규정에 차이가 있다(표 1). 우리나라 식품의약품안전처에서는 난류, 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토, 아황산류, 호두, 닭고기, 쇠고기, 오징어, 조개, 굴, 전복, 홍합 등 총 21종을 알레르기 유발식품으로 지정하여 이를 원재료로 사용한 경우 식품에 함유된 양에 관계없이 원재료 명을 표시하도록 하고 있다(4). 최근에는 소아에게 중증 알레르기 반응을 유발하는 식품인 '잣'을 알레르기 유발 물질 표시대상에 포함하여 표시제도를 확대, 보완하고 있다(5). 또한 표시 규정이 없었던 패스트푸드나 학교급식 같은 오픈 마켓에서도 알레르기 유발 식품 표시를 의무화하여 규제를 강화하고 있다(6). 전 세계적으로 알레르기 유발 식품에 대한 표시 규제를 강화하고 있으나, 표시 미흡으로 인한 사고 사례는 끊임없이 발생하고 있다. 소비자위해 감시시스템(CISS)에 따르면 식품 알레르기 사고 건수는 2013년 316건에 비해 2017년 599건으로 2배 가까이 증가하였으며, 같은 기간 동안 식품 내 알레르기 유발 성분 표시위반으로 적발된 제품은 총 24건으로 보고되었다(7). 2017년 2월 국내에서 알레르기 유발 물질인 밀을

* Correspondence to: Hae-Yeong Kim
Department of Food Science and Biotechnology,
Kyung Hee university, Yongin 17104, Korea
Tel: +82-31-201-2660 Fax: +82-31-204-8116 E-mail: hykim@khu.ac.kr

표 1. 국내 · 외 알레르기 유발 물질 표시 대상

국가	식품원료
한국	메밀, 밀, 대두, 호두, 땅콩, 복숭아, 토마토, 난류(가금류), 우유, 닭고기, 소고기, 새우, 고등어, 홍합, 전복, 굴, 조개류, 게, 오징어, 아황산 포함식품 (최종제품에 SO_2로 10mg/kg 이상 함유한 경우에 한함)
FDA	우유, 계란, 생선, 조개류, 너트류, 밀, 땅콩, 대두
Codex	글루텐이 포함된 시리얼, 갑각류, 계란, 생선, 땅콩, 대두, 우유, 너트류, 아황산 포함식품 (최종제품에 SO_2로 10 mg/kg 이상 함유된 경우에 한함)
E.U.	시리얼, 갑각류, 계란, 생선, 땅콩, 대두, 우유, 너트류, 샐러리, 겨자, 참깨, 연체동물 아황산 포함식품 (최종제품에 SO_2로 10 mg/kg 이상 함유된 경우에 한함)
일본	(의무표시) 밀, 메밀, 식용조류 알, 우유, 땅콩, 새우, 게 (권장표시) 전복, 오징어, 연어알, 소고기, 돼지고기, 닭고기, 연어, 고등어, 대두, 호두, 오렌지, 키위, 복숭아, 사과, 참마, 젤라틴, 바나나, 송이버섯
홍콩	글루텐이 포함된 시리얼, 갑각류, 계란, 우유, 땅콩, 콩, 생선, 너트류
싱가포르	갑각류, 어류, 난류, 땅콩, 견과류, 대두, 우유, 글루텐 함유 곡물, 아황산염 (최종제품에 SO_2로 10 mg/kg 이상인 경우)

표시하지 않은 견과류 가공품이 회수되는 사례가 발생하였다(8). 2011년에는 캐나다로 수출한 한국식품에서 식품 알레르기 표기 사항이 누락되어 경고 및 리콜조치를 받은 바 있다(9). 표기 사항 불량으로 인한 회수 등과 같은 행정적 조치와 다른 나라의 표시 규정에 맞지 않아 발생하는 법적 제제 및 인명에 대한 피해를 최소화 하기 위해 알레르기 유발 식품에 대한 정확한 정보를 제공하는 것이 필요하다. 오늘날 가공식품의 종류와 그 수는 점점 증가하고 있으며, 가공시설의 공유, 운반, 유통 중의 혼입으로 인한 교차오염 사고도 발생할 수 있다(10).

알레르기 유발물질의 혼입여부를 판별하기 위해서는 단백질을 검출 대상으로 하는 ELISA (Enzyme-linked immune sorbent assay)와 DNA를 검출 대상으로 하는 유전자분석법인 PCR (Polymerase chain reaction)이 주로 사용된다. ELISA의 경우에는 식품에서 단백질을 추출하여 항원-항체 반응을 통해 특정 항원의 존재여부를 판단하게 된다. 이와 같은 방법은 비교적 저렴하고, 사용하기 편리하다는 장점이 있지만, 열처리된 가공식품에는 적용이 어렵다는 단점이 있다(11). 알레르기를 가진 환자는 소량의 알레르기 유발물질로도 치명적일 수 있기 때문에 최근에는 민감도가 높고, 비교적 열에 안정한 DNA를 증폭하여 검사하는 PCR법을 이용하고 있다(12). 최근 알레르기 유발물질 분석을 위해 개발된 PCR products의 크기는 약 200 bp 이하로, 열과 압력에 의해 파괴된 DNA에도 적용 가능하기 때문에 가공식품을 대상으로 한 식품 알레르기 검출에 용이하다(13).

식품 알레르기 사고의 증가 추세에 따라 식품 알레르기 검출 연구는 계속해서 진행되고 있으며, 본 총설에서는 유전자 분석법을 이용한 알르레기 유발물질 판별법에 대해 논하고자 한다.

2. 유전자 분석에 의한 알레르기물질 판별방법

1) 알레르기 유발 물질 검출을 위한 대상유전자 탐색 및 선정

World Health Organization과 International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS)에서는 식품의 알레르기 유발 단백질의 데이터베이스를 구축하였으며, www.allergen.org를 통해 allergen의 정보를 수집할 수 있다. 프라이머의 제작을 위한 유전자 정보는 NCBI Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록된 데이터베이스를 활용할 수 있다. 알레르기 유발 물질 검출을 위한 PCR법에는 주로 종 특이 프라이머나 알레르기 유발 단백질을 암호화하는 유전자를 대상으로 다른 종의 유

전자와 서열 비교(alignment)를 통해 특이적으로 증폭 시킬 수 있는 프라이머를 제작하여 사용한다(그림 1). 제작된 프라이머는 높은 증폭 효율을 보이도록 PCR 반응액 및 온도 조건을 최적화하여 검사법을 확립하며, 대상으로 하는 유전자의 증폭 여부를 확인하여 종을 판별하게 된다.

PCR에 이용되는 유전자는 알레르기 유발 단백질을 암호화하는 유전자, Cytochrome b, 18S, 16S rRNA 등이 있다(14). 미토콘드리아 DNA를 타겟으로 이용하면 높은 copy 수로 인해 민감도가 높다는 장점이 있고, 알레르기 유발 단백질을 암호화하는 핵 DNA를 이용하면 단일 copy로 정량분석을 보다 정확하고 재현성 있게 추측할 수 있다. 알레르기 검출에 이용되는 여러 종류의 유전자를 실험의 목적에 맞게 선택하여 사용되고 있다 (15).

2) 알레르기 유발 물질의 혼입 유무 판별법

가) 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

식품 내 존재하는 알레르기 유발 물질을 검사하는 가장 일반적인 유전자 분석 방법은 Polymerase Chain Reaction (PCR)이다. PCR반응에 사용되는 Polymerase는 소량의 template DNA를 매 cycle 마다 2^n의 양으로 증폭시키기 때문에 매우 민감도 높은 방법이며, 종 특이 프라이머나 알레르기 유발 서열을 증폭하는 특이 프라이머를 이용하여 식품 중 알레르기 유발 물질의 혼입 유무를 판단 할 수 있다(16). 일본에서는 알레르기 유발 고 위험군인 땅콩, 밀, 메밀 3종을 PCR을 통해 검출하였으며, 이를 「알레르기 유발물질을 포함한 식품의 검사방법」이라는 책자를 통해 고시하고 있다(17). 우리나라의 경우 알레르기를 유발하는 주요 식품에 대한 공인 시험법이 확립되지 않았으며, 식품의약품안전평가원 식품위해평가부에서 유전자분석법을 이용한 알레르기 유발물질 신속검출법을 개발한 바 있다. 종 특이 프라이머를 사용하여 돼지, 고등어, 게, 새우, 우유, 계란, 복숭아, 토마토, 밀, 메밀, 대두, 땅콩, 아몬드, 참깨 총 14종의 식품을 end-point PCR을 통해 검출하는 연구를 보고하였다(11). 선행된 연구 자료들에 사용된 프라이머와 새로 개발된 종 특이 프라이머를 사용하여 14종의 원재료를 효율적으로 검출할 수 있도록 annealing 온도(45~67℃)와 시간(5~30초)을 달리하여 PCR반응을 최적화하였으며, 개발된 검사법이 제조업체 및 소비자를 보호하는데 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 기대한다. 코젠바이오텍에서는 갑각류, 대두, 땅콩, 우유, 돼지고기, 계란에 대한 알레르기 유발 원재료 검출용 PCR검사와 검출용 PCR kit를 판매하고 있으며, 이에 대한 특허를 소유하고 있다(KR100720867B1). Yano 등은 *chloroplast maturase (matK)* gene을 검출하는 특이 프라이머를 개발하여 가공식품에서 호두와 피칸의 검출법을 개발하였다(18). 제작된 프라이머는 호두와 피칸을 모두 검출하였으며, 증폭산물에 제한효소(*Bfa1*)의 작용 유무를 판단하여 호두와 피칸을 각각 검출하였다. 땅콩의 알레르기 유발 단백질인 agglutinin의 유전자 서열을 증폭하는 프라이머를 통해 식품 중 땅콩성분을 검출한 논문도 보고된 바 있다(19). 검출한계는 대두 DNA에 땅콩 DNA가 0.1%까지 혼입된 경우로 확인되었고, 5~10%의 땅콩이 함유된 가공식품 6종 모두에서 검

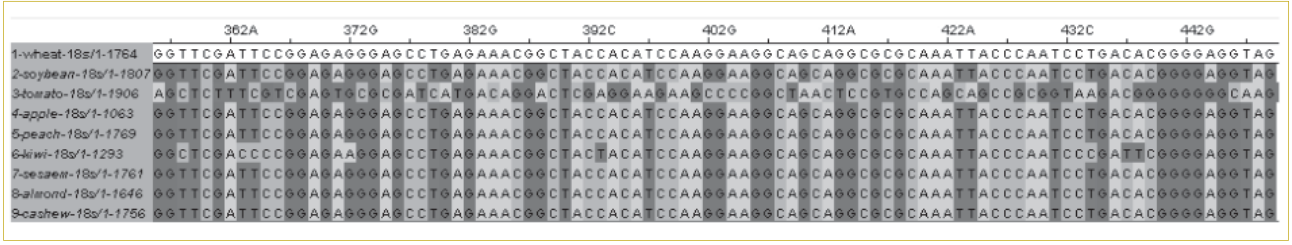

그림 1. 염기서열 비교(Alignment). 특이 프라이머를 제작하고자 하는 종과 서열이 유사한 대조군들을 대상으로 염기서열 비교(Alignment)를 통해 특이적인 부분 선정

출되었다.

나) 다중 (multiplex) PCR 방법

한 번의 PCR 반응으로 두 개 이상의 대상을 동시에 증폭시켜 확인하는 multiplex PCR법은 여러 종의 식품 원료가 혼입된 경우 유용하며, 한 번의 실험으로 여러 타겟을 확인 할 수 있어서 간편하면서도 실험에 소요되는 시간을 줄일 수 있다는 장점을 가지고 있다(20). 정확하고 재현성있는 multiplex PCR 결과를 얻기 위해서는 각 타겟이 유사한 증폭 정도를 가져야 하기 때문에 사용되는 각 프라이머의 농도, annealing 온도, 시간 등을 조절하여 PCR 반응을 최적화해야 한다(21). 소시지를 대상으로 의도, 비의도적인 혼입여부를 검사하기 위해 콩, 가금류, 말, 돼지의 내재 유전자, 12S rRNA, cytb, ATPase를 증폭하는 각각의 프라이머를 사용하여 tetraplex PCR을 개발하였다(22). 소고기에 각 샘플이 0.01%씩 포함된 경우에도 검출이 가능했고, 20종의 소시지를 대상으로 적용가능성을 확인하였다. 땅콩과 헤이즐넛의 알레르기 유발 서열을 증폭하는 특이 프라이머와 식물 내재 프라이머를 사용하여 triplex PCR을 실시하였으며, 60종의 가공식품을 대상으로 혼입여부를 검사하였다(23). 2016년에는 식물성 알레르기 식품군인 헤이즐넛, 피스타치오, 오트밀, 참깨, 땅콩, 캐슈넛, 보리, 밀, 콩, 피칸의 알레르겐 서열을 증폭시키는 decaplex PCR을 개발하였으며, 20종의 가공식품에 적용하여 혼입여부를 검사하였다(24).

다) 실시간(real-time) PCR 방법

알레르기 유발물질의 혼입여부와 혼입량을 신속하고, 특이적으로 확인할 수 있는 검사법이 요구됨에 따라 PCR반응을 실시간으로 확인할 수 있고, 정량이 가능한 real-time PCR법이 개발되었다. Real-time PCR법은 TaqMan probe나 SYBR Green dye를 활용하여 PCR반응 시 발생하는 형광감도를 측정하는 방법이다. TaqMan 기술은 5'말단에는 reporter dye를 3'말단에는 quencher dye를 부착한 probe가 주형 서열과 상보적인 부분에 결합하고, polymerase에 의한 증폭이 진행되면, reporter dye가 quencher dye와 분리되어 형광을 나타내게 된다. SYBR Green 기술은 증폭이 진행된 double-stranded DNA에 intercalating dye인 SYBR Green이 결합하여 형광을 나타내게 된다(그림 2)(25). 최근 미국 FDA에서는 갑각류를 대상으로 종 특이 프라이머와 TaqMan probe를 제작하여 real-time PCR을 활용한 분석법을 개발하였다(26). 스페인에서는 알레르기 검사법으로 많이 사용되는 ELISA법과 종 특이 프라이머를 적용한 real-time PCR법을 소, 돼지를 대상으로 비교하여 유전자 분석법이 가공식품의 알레르기 검사에 있어서 ELISA보다 소는 약 2배, 돼지는 약 100배 정도 민감하게 검출할 수 있음을 증명했다(27). TaqMan 방식 외에도 SYBR Green fluorescence dye를 사용하여, 헤이즐넛, 호두, 피스타치오의 알레르기 유발 서열을 대상으로 real-time PCR법을 개발하였으며, 열처리 시료를 제작하여 가공식품에도 효율적으로 적용할 수 있음을 확인하였다(28-30). 두 개의 종 특이 프라이머를 통해 혼합을 특이적으로 검출할 수 있는 방법이 개발되었으며, 서로 다른 함량을 가진 시료를 제작하여 미지의 시료로부터 상대정량의 가능성을 제

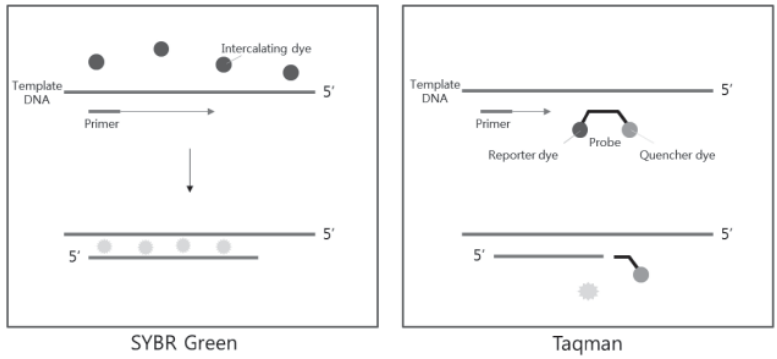

그림 2. Intercalating dye를 이용한 SYBR Green법과 reporter dye와 quencher dye가 부착된 probe를 이용한 TaqMan법

시하였다(31). Real-time PCR 역시 두 가지 이상의 프라이머와 각각 다른 reporter dye와 quencher dye를 부착한 probe를 사용하여 형광신호를 검출하면 두 종 이상의 식품원료를 검출할 수 있다. 종 특이 프라이머를 사용하여 두 가지 Multiplex real-time PCR법(A11A11C: 헤이즐넛, 땅콩, 콩, 겨자, 셀러리, A11A11D: 캐슈넛, 우유, 아몬드, 계란, 참깨, 호두, 피스타치오)을 개발하였으며, 서로 다른 함량을 가진 시료를 통해 검출한계를 측정한 결과 두 개의 세트 모두 0.1%까지 검출되었다(32).

라) 최신기술을 이용한 방법 – Fast real-time PCR, DNA microarray method

최근에는 열 전달 시간을 줄일 수 있는 DNA chip (33)이나 특별한 PCR buffer들을 사용하여 분석시간을 대폭 감소한 방법들이 사용되고 있다. 시중에 판매하고 있는 PCR buffer를 사용하여 DNA polymerase의 활성 시간을 단축하고, 각 PCR cycle의 지속시간을 감소시키는 방법을 통해 갑각류와 생선을 약 40분 내외로 검출할 수 있는 Fast real-time PCR법을 개발하였다(34, 35). 또한 PCR을 Digital Versatile Disk (DVD)과 접목하여 식품 안에 포함된 알레르기 유발 원재료 검출법을 개발하였다. DVD에 제작된 5'-Biotinylated-probe를 부착하고, DNA의 증폭에는 5'-Digoxin-primer를 사용하여 헤이즐넛, 땅콩, 대두을 타겟으로한 PCR반응 후 DVD에서 Btn-probe와 Dig-target의 결합으로 발생하는 형광을 측정하여 타겟의 존재 유무를 판단한다(36). 2개 이상의 샘플을 검출하는 경우 real-time PCR보다 저렴하고, 이동성이 좋기 때문에 현장 적용이 가능하다는 장점이 있다.

3. 결론

일반적인 알레르기 검출법은 식품 유래 단백질을 타겟으로 항원-항체 반응을 통해 이루어 진다. 가공 식품은 고압, 열처리, 산처리 등의 제조 공정을 거치면서 단백질의 변성을 발생시키기 때문에 항원-항체 반응을 통한 검출이 어렵다. 반면 유전자분석방법을 활용한 알레르기 유발 물질 검출법은 단백질보다 열에 안정한 DNA를 타겟으로 민감하고 신속하게 검출하여 올바른 표시 및 정보를 제공하는데 기여할 수 있다. 또한 가공식품의 제조, 운반, 유통 중 발생할 수 있는 교차 오염을 사전에 검사할 수 있기 때문에, 알레르기 사고 위험을 감소시켜 소비자와 제조업체를 보호하고 나아가 시중에 판매되는 가공식품들을 모니터링하고 감시하는 데에 유용하게 활용될 것으로 기대하는 바이다.

4. 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전평가원 (16163실용연003)에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Son DY, Yoon KR, Lee SI, Study of the Most Common Allergic Foods in Korea. *Korean Journal of Food Science and Technology* 34: 885-888 (2002)

2. Wen HW, Wlodzimierz BW, Thomas RD, Richard AD, Peanut Allergy, Peanut Allergens, and Methods for the Detection of Peanut Contamination in Food Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6: 47-58 (2007)

3. Besler M,Determination of allergens in foods. *Trends in Analytical Chemistry* 20: 662-672 (2001)

4. 한국식품의약품안전처, 2016, 일부개정 고시전문고시 제 2016-149 호

5. 한국식품의약품안전처, 2017, 일부개정고시(안) 행정예고

6. 한국식품의약품안전처, 2017, 일부개정 고시전문고시 제 2017-15호

7. http://www.hkbs.co.kr/news/articleView.html?idxno=440747

8. 한국식품의약품안전처, 보도자료 (2017)

9. http://news20.busan.com/controller/newsController.jsp?newsId=20111029000022

10. 한국식품의약품안전처, 식품알레르기 가이드라인, 2016

11. Park YC, Kim MR, Shin JH, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Lee SJ, Han SB, Development of PCR Method for Rapid Detection of Allergic Materials in Foods. *Journal of Food Hygiene and Safety* 28: 124-129 (2013)

12. Sarri C, Stamatis C, Sarafidou T, Galara I, Godosopoulos V, Kolovos M, Liakou C, Tastsoglou S, Mamuris Z, A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control* 43: 35-43 (2013)

13. Zagon J, Schmidt J, Schmidt AS, Broll H, Lampen A, Seidler T, Braeuning A, A novel screening approach based on six real-time PCR systems for the detection of crustacean species in food. *Food Control* 79: 27-34 (2017)

14. Eischeid AC, Kim BH, Kasko SM, Two Quantitative Real-Time PCR Assays for the Detection of Penaeid Shrimp and Blue Crab, Crustacean Shellfish Allergens. *Agricultural and food chemistry* 61: 5669-5674 (2013)

15. Sentandreu M, Sentandreu E, Authenticity of meat products: Tools against fraud. *Food Research International* 60: 19-29 (2014)

16. Shu JJ, Wang QW, Yong KY, Programmable DNA-Mediated Decision Maker. *International Journal of Bio-Inspired Computation* 10: 51-55 (2017)

17. 한국식품의약품안전처, 일본의 알레르기 유발식품 검사법 규정 2008

18. Yano T, Sakai Y, Uchida K, Nakao Y, Ishihata K, Nakano S, Yamada T, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Maitani T, Detection of Walnut Residues in Processed Foods by Polymerase Chain Reaction. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71: 1793-1796 (2007)

19. Lee SJ, Yoon JH, Hong KW, A PCR Method for Rapid Detection of Peanut Ingredients in Food. *Korean Journal of Food Science and Technology* 41: 350-353 (2009)

20. Zang C, Semi-nested multiplex PCR enhanced method sensitivity of species detection in further-processed meats. *Food Control* 31: 326-330 (2013)

21. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE, Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology, *Clinical Microbiology Reviews* 13: 559-570 (2000)

22. Safdar M, Junejo Y, Arman K, Abasiyanik MF, A highly sensitive and specific tetraplex PCR assay for soybean, poultry, horse and pork species identification in sausages: Development and validation. *Meat Science* 98: 296-300 (2014)

23. Rencova E, Piskata Z, Kostelnikova D, Tremlova B, Simultaneous detection of peanut and hazelnut allergens in food matrices using multiplex PCR method. *Acta Veterinaria Brno* 83: 77-83 (2014)

24. Cheng F, Wu J, Zhang J, Pan A, Quan S, Zhang D, Kim H, Li X, Zhou S, Yang L, Development and inter-laboratory transfer of a decaplex polymerase chain reaction assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous detection of ten food allergens. *Food Chemistry* 199: 799-808 (2016)

25. Gasparic MB, Tengs T, Paz JLL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, Zel J, Gruden K, Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 2023-2029 (2010)

26. Eischeid AC, Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of lobster, a crustacean shellfish allergen. *Food Control* 59: 393-399 (2016)

27. Adam TP, Kayleigh KF, Omar N, Rosalee SH, Comparison of real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. *Food Control* 71: 346-352 (2017)

28. Iniesto E, Jimenez A, Prieto N, Cabanillas B, Burbano C, Pedrosa MM, Rodiguez J, Muzquiz M, Crespo JF, Cuadrado C, Real Time PCR to detect hazelnut allergen coding sequences in processed foods. *Food Chemistry* 138: 1976-1981 (2013)

29. Linacero R, Ballesteros I, Sanchiz A, Prieto N, Iniesto E, Martinez Y, Pedrosa MM, Muzquiz M, Cabanillas B, Rovira M, Burbano C, Cuadrado C, Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences. *Food*

Chemistry 202: 334-340 (2016)

30. Sanchiz A, Ballesteros I, Martin A, Reuda J, Pedrosa MM, Dieguez Mdel C, Rovira M, Cuadrado C, Linacero R, Detection of pistachio allergen coding sequences in food products: A comparison of two real time PCR approaches, *Food Control* 75: 262-270 (2017)

31. Grazian S, Gulli M, Marmiroli N, Development and validation of a SYBR-Green I Real-Time PCR test to detect bivalves including *Mytilus* species in foods, *International Journal of Food Science and Technology* 52: 1567-1575 (2017)

32. Koppel R, van Velsen-Zimmerli F, Bucher T, Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food. *European Food Research and Technology* 235: 843-852 (2012)

33. Lim HY, Development of Novel Rapid Detection Method for Deformed Wing Virus (DWV) using Ultra-fast High-Performance PCR (UF-HP PCR). *Journal of Apiculture* 28: 237-244 (2013)

34. Herrero B, Vieites JM, Espineira M, Fast Real-Time PCR for the Detection of Crustacean Allergen in Foods. *Agricultural and food chemistry* 60: 1893-1897 (2012)

35. Herrero B, Vieites JM, Espineira M, Development of an in-house fast real-time PCR method for detection of fish allergen in foods and comparison with a commercial kit. *Food Chemistry*151: 415-420 (2014)

36. Tortajada-Genaro LA, Santiago-Felipe S, Morais S, Gabaldon JA, Puchades R, Maquieira A, Multiplex DNA Detection of Food Allergens on a Digital Versatile Disk. *Agricultural and food chemistry* 60: 36-43 (2012)