

## 가공식품 중 새우의 검출을 위한 샌드위치 ELISA의 개발

도정룡 · 백수연 · 손동화\*  
한국식품연구원, 기능평가연구원

### Development of Sandwich ELISA for the Detection of Shrimp in Processed Foods

Jeong-Ryong Do, Su-Yeon Back, and Dong-Hwa Shon\*

Functionality Evaluation Research Group, Korea Food Research Institute

**Abstract** A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay method (sELISA) for detecting the presence of shrimp in processed foods was developed using rabbit polyclonal antibodies against tropomyosin produced by black tiger prawns (shrimp). Based on the standard curve derived using this method, the detection range of shrimp was determined to be 1-100 µg/mL. The cross-reactivity of these antibodies toward black tiger prawns, fleshy prawns, cocktail prawns, lobster, and blue crab was 100, 73, 155, 18, and 0%, respectively. When shrimp was heated for 10 min, the mean assay recovery of tropomyosin was 121-221% at 70-100°C and 7.8% at 121°C. When shrimp was added to cream soup, weaning food, sausage, fish paste, and sauce, the mean assay recovery was 397, 639, 168, 234, and 0%, respectively. In sample tests involving 14 commercial items, the coincidence ratio of assay results and reference was 79%.

**Keywords:** shrimp tropomyosin, polyclonal antibodies, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, processed foods

## 서 론

음식물 섭취에 의하여 유발되는 식품알레르기는 생체에 들어온 특성의 단백질(알레르겐)에 대한 면역계가 주로 IgE를 매개로 하는 전신적인 과잉반응이 유도되는 이상 현상이다(1). 사람의 체질에 따라 특성을 일으켜져 식품들에 대해 매우 민감하게 반응하여 구토, 설사 등의 위장관 증세와 두드러기, 혈관부종, 천식, 비염, 아토피성 피부염, 신경정신계 이상 증상 등이 나타난다(2).

식품 알레르기는 성인의 3-5%에서 나타나는 것으로 알려져 있으며 그 빈도는 나이가 어릴수록 높아지며 영·유아에게는 6-8%까지 나타난다(3). 우리나라에서는 식품 알레르기와 관련하여 난류(가금류에 한해), 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토, 아황산염 등 총 13종을 함유하거나 이 들로부터 추출한 성분을 원료로 사용했을 때는 함유된 양과 관계없이 원재료명의 표시를 의무화하고 있다(4).

새우(*Penaeus aztecus*)의 주요 알레르겐(Pen a1, 36 kDa)으로 알려진 tropomyosin은 새우, 게, 가재, 랍스터 등의 갑각류에 모두 함유된 근섬유 단백질이며 열안정성 단백질(heat-stable protein, HSP)이다(5,6). 또한 새우 tropomyosin은 물에 잘 녹으며, 새우 알레르기 환자 혈청과 강한 결합력을 가져 새우 알레르기에 대한

과민반응이 매우 민감하여 성인에게서 많이 발생된다고 알려졌다(7,8).

새우 알레르기 환자는 새우의 섭취가 극심하게 제한되어야 하므로 가공 식품 중에 새우의 첨가여부를 제대로 표시하였는지 확인하는 것은 보호측면에서 꼭 필요하다(9). 또한 가공식품에는 다양한 원료가 사용되었지만 그 혼합여부를 정확하게 알 수 없는 경우가 많아 새우의 함유여부를 확인할 수 있는 검출법의 개발이 필요하다.

ELISA법(효소면역측정법)은 의료분야의 진단이나 사이토카인 분석 등에 널리 적용되고 있는데, 이는 항원-항체의 특이적인 반응을 이용하여 검출감도가 높고 분석시간이 짧으며 많은 시료를 동시에 분석할 수 있는 장점이 있다(10). ELISA에 의한 단백질 분석법은 경쟁과 비경쟁(competitive/non-competitive) 방식이 있다. 경쟁 방식은 다시 둘로 직접검출법(direct competitive ELISA, cdELISA)과 간접검출법(indirect competitive ELISA, ciELISA)가 있으며, 비경쟁 방식은 sandwich ELISA가 대표적으로 활용되고 있다. Sandwich ELISA는 고상화한 항체가 단백질을 효과적으로 포착하고, 여기에 항체-효소 접합체(antibody-enzyme conjugate)를 작용시키는 방식으로써 일반적으로 그 감출감도가 경쟁방식보다 우수한 장점이 있다(11).

본 연구에서는 열에 안정한 새우 tropomyosin을 실험동물에 면역하여 새우에 대해 매우 높은 특이성을 나타내는 항체를 생산하고, 이를 이용하여 샌드위치 ELISA 조건을 확립하였다. 또한 새우의 열처리에 따른 항체의 반응성 변화, 갑각류에 대한 항체의 교차반응, 새우 첨가량을 달리한 식품을 제조하여 새우 tropomyosin의 회수율을 확인하고, 시판 중인 가공식품 내의 새우를 검출하였다.

\*Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea  
Tel: 82-31-780-9133

Fax: 82-31-709-9876

E-mail: dhs95@kfri.re.kr

Received April 14, 2014; revised July 23, 2014;

accepted July 25, 2014

## 재료 및 방법

### 재료

Phosphate buffered saline (PBS: 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, pH 7.4), PBS with Tween 20 (PBST), phosphate citrate buffer tablet, 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride (TMB), Freund's adjuvant, carbamate-bicarbonate buffer, horseradish peroxidase (HRP) 등은 Sigma-Aldrich Korea (Yongin, Korea)로부터 구입하였다. ELISA를 위한 항 새우 tropomyosin 항체 및 특이항체-효소 결합물은 자체적으로 제작한 것을 사용하였다. New Zealand White 종 토끼는 한림실험동물 (Pyeongtaek, Korea)로부터 구입하였으며, microplate는 Nunc사 (Roskilde, Denmark)의 Maxisorp™를, microplate reader는 Molecular Devices사(Sunnyvale, CA, USA)의 ThermoMax™를 사용하였다. 갑각류와 가공식품류 시료는 성남시 분당소재 할인매장에서 구입하였고, 특히 후자의 경우 국내 및 국외 제품 중 소스류 3종, 복합조미료류 6종, 경단류 3종, 만두류 2종, 총 14점을 무작위로 확보하였으며, 그 외에 크립수프, 이유식, 소시지, 어묵, 소스 등을 실험에 사용하였다.

### 새우 tropomyosin 정제

Full 등(12)의 방법에 따라 홍다리 새우(black tiger prawn, *Penaeus monodon*)의 고염용액 용해성단백질인 tropomyosin을 정제하였다. 근육조직에 2배(v/w)의 저염완충용액(20 mM KCl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT)을 첨가하여 균질화한 후 면포로 잔사를 회수하였다. 그 새우 조직에 2배(v/w)의 95% 에탄올을 혼합하여 10분간 실온에서 방치하고 면포로 잔사를 회수하는 과정을 2회 반복한 후, 다시 2배(v/w)의 diethyl ether을 혼합하여 면포로 잔사를 회수하는 과정을 2회 반복하였다. 남은 새우 조직에 동량의 고염완충용액(1 M KCl, 25 mM Tris-acetate (pH 8.0), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT)을 혼합하여 실온에서 하룻밤 방치하였다. 이를 면포로 여과하여 얻어진 용액과 황산암모늄(208 g/L)을 혼합하여 4°C에서 30분간 방치 후 10,000×g에서 10분간 원심분리 하였다. 그 침전물을 회수하여 2배의 tris-acetate buffer (5 mM, pH 7.5)와 혼합하여 4°C에서 하룻밤 투석한 후, DEAE 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 tris-acetate buffer (5 mM, pH 7.5)에 NaCl 농도를 150-350 mM이 되도록 처리하여 새우 단백질을 분리하였다. 이들 분획물의 분자량 및 순도 확인을 위하여 Laemmli 방법(13)에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다.

### 특이항체의 생산

Kim 등(14)의 방법에 따라 특이항체를 생산하였다. 토끼의 등 피부에 마리 당 500 µg의 tropomyosin 용액과 Freund's complete adjuvant를 1:1로 혼합한 유탁액 1 mL을 피하주사 하였다. 이어서 2주 간격으로 3차례 추가면역을 실시하였다. 다만, 이때에는 adjuvant로서 Freund's incomplete adjuvant를 사용하였다. 매 면역 일주일 후, 토끼의 귀 정맥으로부터 채혈하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리(1,000×g, 20 min)하여 항혈청을 분리하였다. T-Gel™ Purification Kit (Pierce Co., Rockford, IL, USA)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 항혈청으로부터 항체를 정제한 후, PBS에 투석하여 사용하였다.

### 특이항체-효소 복합물의 제조

항 tropomyosin 항체-효소 결합물(anti-tropomyosin antibody-HRP conjugate)을 다음과 같이 제조하였다. HRP 2 mg과 sodium

periodate 21.4 mg을 증류수 1 mL에 용해시키고 상온에서 10분 반응 후 5 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)에서 하룻밤 투석시켰다. 회수 후 0.2 M sodium carbonate buffer (pH 9.5)를 첨가하여 HRP 용액을 pH 9.0으로 조절한 다음 0.01 M sodium carbonate buffer (pH 9.0)에 대하여 투석한 특이항체(8 mg/mL) 1 mL와 함께 혼합한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 0.1 M sodium tetrahydroborate 100 µL를 첨가해 4°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 회수하여 PBS로 투석하여 사용하였다.

### 샌드위치 ELISA (sELISA)

정제한 항 tropomyosin 항체를 coating buffer (0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.0)에 2 µg/mL의 농도로 희석하여 microplate에 각 well 당 100 µL씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 정치하였다. 이후 통상의 blocking 과정을 생략하고 washing buffer (PBST) 내에서 항원항체반응을 유도하였는데, 이는 Tween 20의 존재 하에서 비특이적인 반응이 억제되기 때문이다(15). 즉, coating 과정이 끝난 각 well을 200 µL의 washing buffer로 3회 세척한 다음, 시료용액을 각 well 당 100 µL씩 첨가하고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 앞에서와 같이 세척한 다음 PBST로 1/100로 희석한 항 tropomyosin 항체-효소 결합물을 well 당 100 µL씩 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 3회 세척한 후 well 당 100 µL의 기질 용액(0.01% TMB in phosphate-citrate buffer, pH 5.0 with 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 넣고 상온에서 30분 동안 발색시킨 후, 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 50 µL씩 각 well에 넣어 발색 반응을 중지시켰다. 이를 microplate reader로 흡광도(A<sub>450</sub>)를 측정하였다. 표준분석 시료는 black tiger prawn로 하였으며, 모든 시료는 3반복 처리하여 얻은 평균값을 사용하였다.

### 시료의 처리

분석용 시료의 단백질 추출을 위하여 1 g의 시료에 4 mL의 PBS를 넣고 homogenizer (Ultra Turrax T125, IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)를 이용하여 4,500×g에서 1분간 균질화한 다음 70°C, 10분간 가열하였다. 이를 10,000×g에서 20분간 원심분리하고 상정액을 회수하였다. 이를 다시 PBST로 적당배율 희석하여 분석에 사용하였다.

### 특이항체의 교차반응

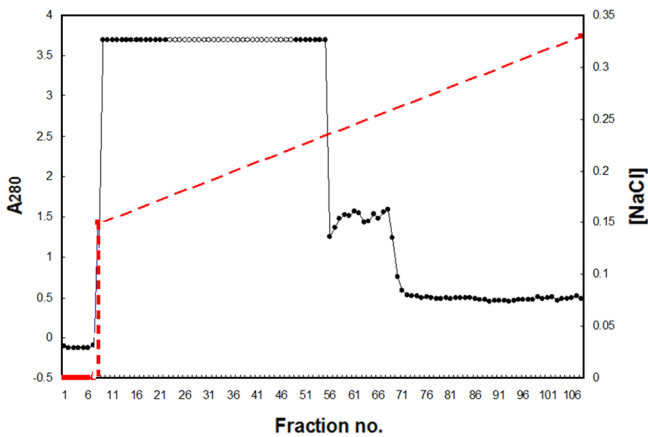
특이항체가 면역원(tropomyosin) 이외의 갑각류에 대해 반응하는 정도를 조사하였다. 즉, 홍다리 새우, 흰다리 새우, 카테일 새우, 바다가재, 꽃게 등을 시료처리 방법에 따라 준비한 후, 각각 여러 농도의 시료용액에 대하여 sELISA를 실시하였다. 본 연구에서 특이항체의 교차반응율은 다음 식에 의하여 구하였다. 식에서 C<sub>A450=1/2max</sub>은 sELISA의 수치(A<sub>450</sub>)가 최고발색치의 50%를 나타낼 때의 시료 농도를 나타내었다.

Cross-reactivity (%)

$$= (C_{A450=1/2max} \text{ of black tiger prawn} / C_{A450=1/2max} \text{ of crustacea}) \times 100$$

### 새우 tropomyosin의 열안정성 조사

홍다리 새우(tropomyosin)를 25, 70, 80, 90, 100, 121°C에서 각각 10분간 열처리하고 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상정액에 대하여 sELISA를 실시하였다. 이때 새우 tropomyosin의 열안정성은 처리온도별 반응율을 기준으로 판단하였으며, 다음 식에 의하여 구하였다. C<sub>A450=1/2max</sub>은 sELISA의 수치(A<sub>450</sub>)가 최고발색치의 50%를 나타낼 때의 시료 농도를 나타내었다.



**Fig. 1. Chromatogram of shrimp muscle proteins on DEAE ion-exchange column.** Open circle fractions were pooled for further purification of shrimp tropomyosin.

Reactivity (%)

$$= (C_{A450=1/2max} \text{ at } 25^{\circ}C / C_{A450=1/2max} \text{ at the given temperature}) \times 100$$

**검출법의 신뢰성 검증 및 시판시료의 분석**

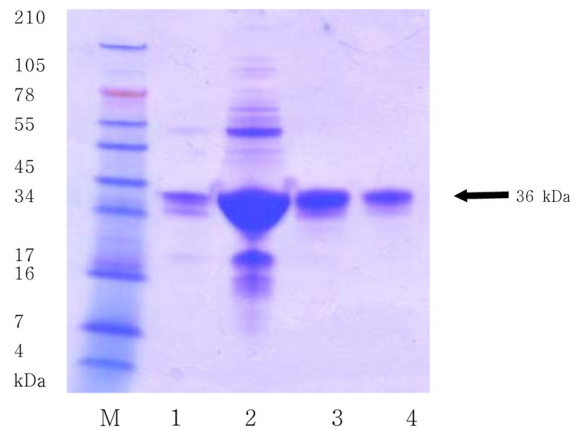
ELISA 검출법의 신뢰성을 검증하기 위하여 spike test를 실시하였다. 즉, 가공식품(크림수프, 이유식, 소시지, 어묵, 소스)에 새우를 첨가하고, 그 속에 함유된 새우의 함량을 sELISA로 분석하였다. 최종 30-1,000 ppm의 새우 첨가 시료에 추출완충액(5 g SDS, 20 mL 2-ME in 1 L PBS)을 20배 첨가하여 상온에서 16시간 교반한 다음, 10,000×g에서 20분간 원심분리한 추출액을 PBS로 20배 희석하여 sELISA를 실시하였다. 따라서, ELISA 분석치에 희석계수(20×20=400)를 곱하여 시료 중의 농도를 구하였다. 또한, 이 수치와 새우 첨가량을 비교하여 분석 회수율을 구하였다.

한편 본 연구에서 개발한 sELISA를 이용하여 위와 동일한 방법으로 시판 시료 14점의 새우 검출을 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**새우 단백질의 정제 및 특이항체의 생산**

새우의 tropomyosin을 면역원으로 사용하고자 이온교환 크로마토그래피로 홍다리 새우 단백질을 분리, 정제하였다(Fig. 1). 이들 분획물의 단백질을 SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 2). 새우 tro-



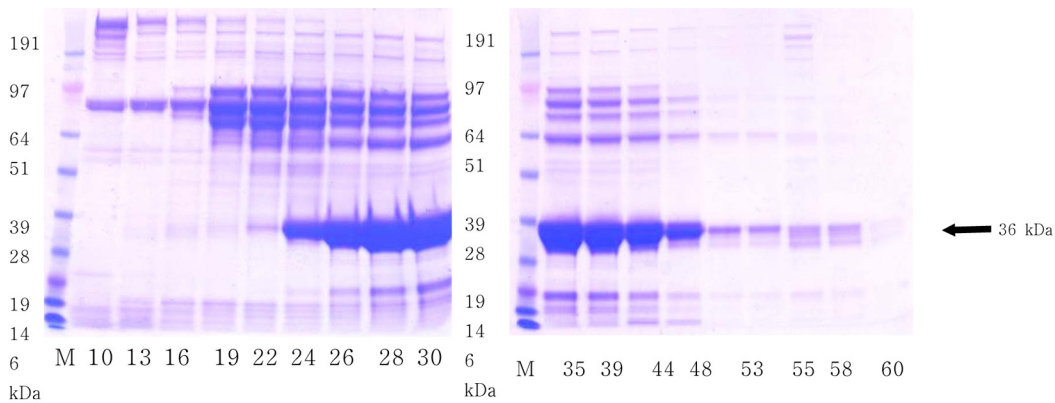
**Fig. 3. SDS-PAGE patterns of shrimp tropomyosin.** Lanes M, Marker; 1, Shrimp muscle proteins; 2, pooled fractions from DEAE ion-exchange chromatography; 3, 4, purified shrimp tropomyosin from major band of large SDS-PAGE gel.

omyosin의 분자량은 36kDa이며(5), 200 mM NaCl에서 용출되는 단백질(fraction 24-48, Fig. 1의 흰색 동그라미)을 회수하였다. 다시 이들 분획물을 모아서 tropomyosin에 해당하는 밴드를 잘라내고 정제하여 그 정제도를 SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 3).

**sELISA 확립 및 교차반응**

특이항체와 항체-HRP 복합물을 이용하여 새우를 분석하기 위한 sELISA의 조건을 확립하고 그 표준곡선을 작성하였다(Fig. 4). 이때, 새우의 검출범위는 1-100 ppm (µg/mL), 검출한계는 0.3 ppm으로써 민감한 검출이 가능함을 알 수 있었다.

한편, 교차반응을 알아보기 위하여 70°C에서 10분간 열처리한 갑각류에 대한 특이항체의 반응성을 sELISA로 조사하였다. 그 반응의 정도는 면역원으로 사용하였던 홍다리 새우에 대한 반응성을 100%로 하였을 때, 흰다리 새우 73%, 카테일 새우 155%, 바다가재 18%, 꽃게 0%를 나타내었다(Table 1, Fig. 5). Kamath 등(16)은 새우에서 추출한 tropomyosin에 대하여 단클론 항체를 생산하여 그 특이성을 조사하였을 때 모든 갑각류에서 교차 반응성이 나타날 뿐만 아니라 홍합, 가리비, 다슬기 등의 연체동물에서도 교차반응을 나타내었다고 하였다. 하지만 본 연구에서 생산한 다클론 특이항체는 새우에 대하여 매우 특이적으로 반응했으며 다른 갑각류에 대한 반응은 낮거나 거의 없었다.



**Fig. 2. SDS-PAGE patterns of shrimp tropomyosin derived from the DEAE ion-exchange chromatography in Fig. 1.** Arrow indicates tropomyosin (36 kDa).

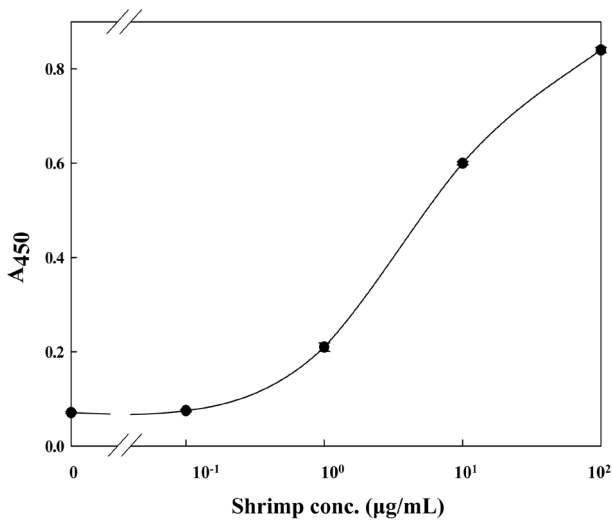


Fig. 4. Standard curve of shrimp by sELISA.

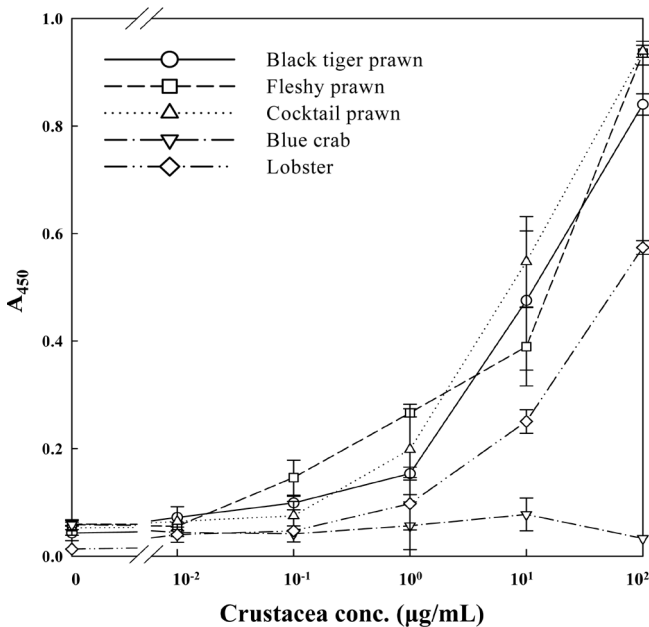


Fig. 5. Reactivity of anti-shrimp tropomyosin antibodies towards heat-treated crustacea determined by sELISA. Crustacea muscle was homogenized and heat-treated at 70°C for 10 min.

Table 1. Cross-reactivity of anti-shrimp tropomyosin antibodies towards crustacea as determined by sELISA in Fig. 5

Crustacea <sup>1)</sup>	C <sub>A450=0.5</sub> (µg/mL)	Cross-reactivity (%) <sup>2)</sup>
Black tiger prawn	11.0	100
Fleishy prawn	15.0	73
Cocktail prawn	7.1	155
Lobster	60.0	18
Blue crab	∞	0

<sup>1)</sup>Crustacea muscle was homogenized and heat-treated at 70°C for 10 min.  
<sup>2)</sup>Cross-reactivity (%)=(C<sub>A450=0.5</sub> of black tiger prawn/C<sub>A450=0.5</sub> of crustacea) ×100

새우 단백질의 열안정성

새우의 열처리 정도에 따른 특이항체의 반응성을 sELISA로 조사하였다(Table 2, Fig. 6). 그 결과 70-121°C까지 각각 10분간 열

Table 2. Reactivity of anti-shrimp tropomyosin antibodies towards heat-treated shrimp as determined by sELISA in Fig. 6

Temp. (°C) <sup>1)</sup>	C <sub>A450=0.7</sub> (µg/mL)	Reactivity (%) <sup>2)</sup>
25	6.4	100
70	2.9	221
80	5.3	121
90	5.0	128
100	4.3	149
121	82.0	7.8

<sup>1)</sup>Shrimp (black tiger prawn) muscle was homogenized and heat-treated at each temperature for 10 min.

<sup>2)</sup>Reactivity (%)=(C<sub>A450=0.7</sub> at 25°C/C<sub>A450=0.7</sub> at heat-treated temp.)×100

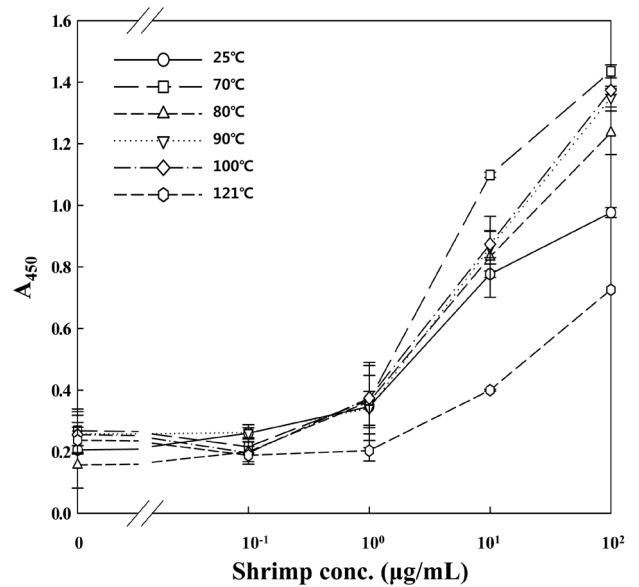


Fig. 6. Heat stability of shrimp as determined by sELISA. Shrimp muscle was homogenized and heat-treated at each temperature for 10 min.

처리하였을 때 상온처리에 비하여 각 온도별 반응성이 221, 121, 128, 149, 7.8%로 나타났으며 121°C 이상 열처리 시 그 반응성이 1/13로 급격히 감소하였다. 본 연구에서 개발한 sELISA 분석법은 100°C 범위 내에서 새우의 열안정성이 양호하며 실제 열처리한 시료의 분석 시 효과적일 것으로 추측되었다.

신뢰성 검정(Spike test)

신뢰성 검증을 위하여 가공식품에 농도별로 첨가한 새우의 함량을 sELISA로 검출하고 그 분석수치의 회수율을 조사하였다. 대표적인 표준곡선을 Fig. 4에, 분석의 회수율을 Table 3에 각각 나타내었다. 이때, 가공식품군은 크립스프, 이유식, 소시지, 어묵, 소스를 대상으로 하였다. 그 결과 분석상의 회수율은 비교적 안정한 수치를 보였으며 그 평균치는 각각 397, 639, 168, 234, 0%로 나타났다. 소스를 제외한 모든 가공식품은 열처리한 제품임에도 매우 높은 반응을 나타내었다. 분석회수율이 대체로 높게 나타나는 까닭은 검출대상 단백질을 둘러싸고 있는 지방, 염의 함량, pH 등에 의한 매트릭스 효과가 발생하여 항원항체 반응에 영향을 주기 때문이다(17). 특히, 소스에 대한 sELISA 분석이 어려웠는데 이는 소스에 함유된 높은 염 농도나 낮은 pH 등이 항원항체 반응을 극심하게 방해하였기 때문으로 추측하였다. 본 연구의

**Table 3. Assay recovery of shrimp spiked into foods as determined by sELISA**

Added shrimp (ppm)	Detected									
	Cream soup <sup>1)</sup>		Weaning food		Sausage		Fish paste		Sauce	
	Shrimp (ppm)	Recovery (%)	Shrimp (ppm)	Recovery (%)	Shrimp (ppm)	Recovery (%)	Shrimp (ppm)	Recovery (%)	Shrimp (ppm)	Recovery (%)
0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
30	50	167	128	427	75	250	(262)	(872)	N.D. <sup>2)</sup>	0
100	395	395	548	548	156	156	237	237	N.D.	0
300	1,560	520	2,120	707	290	96.6	757	252	N.D.	0
1,000	5,080	508	8,750	875	1,670	167	2,130	213	N.D.	0
Average	-	397±164	-	639±195	-	168±63	-	234±20 (394±320)	-	0

<sup>1)</sup>Foods spiked with shrimp (black tiger prawn) were homogenized, heated and diluted with PBST for the quantitation of shrimp by sELISA.

<sup>2)</sup>Not detected

**Table 4. Detection of shrimp in commercial foods as determined by sELISA**

Type of food	Article code	Common food name	Label of shrimp	ELISA value (A <sub>450</sub> )	Detected (ppm)		Remark <sup>2)</sup>
					(A) Shrimp by ELISA	(B) Shrimp in sample	
Sauce	1	liquid sauce	shrimp	0.079±0.031	N.D. <sup>1)</sup>	-	X
	2	liquid sauce	none	0.097±0.014	N.D.	-	O
	3	liquid sauce	none	0.092±0.008	N.D.	-	O
Artificial seasoning	4	powdered	none	0.061±0.006	N.D.	-	O
	5	powdered	shrimp powder	0.240±0.012	1.22	487	O
	6	powdered	none	0.089±0.005	N.D.	-	O
	7	powdered	shrimp extract	0.077±0.001	N.D.	-	X
	8	powdered	shrimp 4.4%	0.079±0.001	N.D.	-	X
	9	powdered	shrimp 21.9%,	0.495±0.012	5.15	2,060	O
Paste	10	fish paste	shrimp 4.79% shrimp extract 1.27%, shrimp powder 0.76%,	0.701±0.021	16.5	6,600	O
	11	meatball	none	0.065±0.007	N.D.	-	O
	12	fish paste	shrimp 1% shrimp extract	0.174±0.021	0.7	280	O
Dumpling	13	shrimp bun	shrimp 32%	0.853±0.011	84.2	33,670	O
	14	Meat bun	seafood extract	0.280±0.004	1.6	640	O

(B)=(A)×400: because sample was diluted to 1/400 for the assay.

<sup>1)</sup>N.D.=not detectable, less than 2 times of the BKG value (A<sub>450</sub>=0.056)

<sup>2)</sup>“O” means coincidence of ELISA result with reference on the food package, Whereas “X” means discordance. The coincidence ratio was 79%.

결과 새우 함량에 대한 sELISA 분석 회수율이 매우 높게 나타나므로 정량적으로는 다소 차이가 있으나 정성적 분석에는 효과적인 것으로 판단되었다.

#### 가공식품 중 새우의 검출

시중에 유통되는 소스류 3종, 복합조미료류 6종, 경단류 3종, 만두류 2종, 시료 14점의 새우 검출을 실시하였다. 시료의 희석 비율을 400배이며, 흡광도 기본값 0.056의 두 배 이하의 검출되지 않은 것으로 판단하였다. 새우가 함유된 것으로 표시된 9점 시료 중 정성적으로 검출된 것은 6점, 불검출된 것은 3점이었으며, 새우의 함유가 표시되지 않은 시료 5점은 모두 불검출되었다(Table 4). 따라서 표시와 검출이 정성적으로 일치하는 시료는 총 14점 중 11점으로 정성적 검출율은 79%이었다. 일반적으로 가공식품 중에 새우가 함유된 제품이 많지 않고 그나마 소스나

복합조미료에 많이 편중되어 있는데, 특히 소스 중의 새우 검출이 안되는 것은 앞선 spike test에서 밝힌 바와 같이 높은 염농도와 낮은 pH 등에 의한 것으로 추측되었다.

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 새우 tropomyosin에 대한 특이항체를 이용한 sELISA는 소스류와 같은 일부 식품에는 적용이 불가능한 문제가 있지만 일반적인 가공식품 중 새우의 함유유무를 정성적으로 분석하는데 효과적으로 활용 가능한 것으로 판단되었다.

#### 요 약

가공식품 중 새우의 검출을 위한 샌드위치 ELISA(sELISA)의 조건을 확립하기 위해 홍다리 새우의 tropomyosin에 대한 특이항체를 이용하여 하였다. 이때, 새우의 검출범위는 1-100 ppm (µg/

mL)이며, 검출한계는 0.3 ppm이었다. 특이항체의 교차반응 결과, 홍다리새우, 흰다리 새우, 각테일 새우, 바다가재, 꽃게에 대한 반응성은 각각 100, 73, 155, 18, 0%를 나타내었으며 새우에 대한 특이성이 매우 높았다. 열처리한 시료와 항체간의 반응성은 100°C까지는 121-221%로 안정하였으나 121°C에서는 반응성이 급격히 감소하였다(7.8%). 크림스프, 이유식, 소시지, 어묵, 소스에 대한 spike test에서 새우의 분석회수율은 각각 397, 639, 168, 234, 0%로 소스를 제외하고 매우 높게 나타났다. sELISA에 의하여 14점의 시판시료 중 새우의 함유 유무를 조사한 결과, 정성적으로 원료의 표시사항과 일치하는 비율은 79%이었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국식품연구원의 주요사업의 하나로 수행되었습니다.

## References

- Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 218-230 (2008)
- Kamath SD, Abdel Rahman AM, Komoda T, Lopata AL. Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies. *Food Chem.* 141: 4031-4039 (2013)
- Sampson HA. Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 805-819 (2004)
- Korea Food and Drug Administration. Labeling Standards for Foods etc. KFDA Notification No. 2011-67 (2011)
- Jeong BJ, Park KH, Lee HH, Kim KE, Koe SW, Lee KY. Identification and characterization of shrimp allergens in Korea. *Korean J. Asthma. Allergy Clin. Immunol.* 17: 278-285 (1997)
- Leung PS, Chu KH, Chow WK, Ansari A, Bandea CI, Kwan HS, Nagy SM, Gershwin ME. Cloning, expression, and primary structure of *metapenaeus* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 882-890 (1994)
- Daul CB, Slattery M, Reese G, and Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105: 49-55 (1994)
- Daul CB, Morgan JE, Waring NP, McCants ML, Hughes J, Lehrer SB. 'Crustacea allergy' immunologic evaluation shrimp-allergic individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80: 716-722 (1987)
- Shon DH, Kim HJ, Bae GW, Kim SM. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of milk proteins in food. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 564-569 (2000)
- Kwak BY, Ko SH, Park CW, Son DY, Shon DH. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for glyphosate-tolerant soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 366-372 (2003)
- Asensio L, Gonzalez I, Garcia T, Martin R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19: 1-8 (2008)
- Fuller HR, Goodwin PR, Morris GE. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin, in food. *Food Agr. Immunol.* 17: 43-52 (2006)
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- Kim HJ, Shon DH. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of cooked goat meat. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 538-543 (2000)
- Herrmann JE, Hendry RM, Collins MF. Factors involved in enzyme-linked immunoassay of viruses and evaluation of the method for identification of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 10: 210-217 (1979)
- Kamath SD, Abdel Rahman AM, Komoda T, Lopata AL. Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies. *Food Chem.* 141: 4031-4039 (2013)
- Faeste CK, Plassen C. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J. Immunol. Method.* 329: 45-55 (2008)