

감마선 조사된 새우의 검지를 위한 면역분석법의 적용

이주운 · 육홍선 · 조경환 · 차보숙* · 변명우†

한국원자력연구소 방사선식품생명공학기술개발팀

*수원여자대학 식품과학부

Application of Immunoassay for the Detection of Gamma-Irradiated Shrimp

Ju-Woon Lee, Hong-Sun Yook, Kyoung-Hwan Cho, Bo-Sook Cha*
and Myung-Woo Byun†

Team for Radiation Food Science and Biotechnology,

Korea Atomic Energy Research Institute, Taejeon 305-600, Korea

*Dept. of Food Science, Suwon Women's College, Suwon 441-748, Korea

Abstract

Immunoassay was used to study the detection method of irradiated shrimp. Sandwich ELISA was formatted with monoclonal antibody (Ab) (M-IgG) and polyclonal Abs (P-IgG) individually produced against brown shrimp tropomyosin (TPM) as an antigen. When M-IgG was used as a coating Ab to capture TPM, and P-IgG were used as reaction Ab against captured TPM, TPM could be detected in the range of 12.5 to 50 µg/mL. Detected concentrations of TPM from irradiated shrimp decreased dose-dependently, and the concentration of Ag by combination of irradiation with heating or freezing treatments also decreased. This result suggests the possibility for Sandwich ELISA, one of immunological analyses, to be applied for detecting irradiated shrimp.

Key words: shrimp, gamma irradiation, detection method, Sandwich ELISA

서 론

방사선 식품조사기술이 식량자원의 효율적인 관리와 위생화를 위해 화학 훈증제 등의 처리를 대체할 수 있는 새로운 방법으로 소개된 이래로 많은 나라에서 이 기술을 이용한 식품의 보존과 위생화에 대한 연구가 진행되어 왔다(1). 적정 선량으로 조사된 식품의 건전성이 입증됨에 따라(2), 현재 국제적으로 식량교역시 본 기술의 이용이 확대될 전망이다(3). 한편, 새우와 같은 갑각류는 높은 영양가와 독특한 풍미로 인해 기호성이 매우 높은 식품으로서 전세계적으로 많은 양이 소비되고 있으나, 신선도의 유지가 매우 중요하다(4). 특히, *Vibrio*나 *Salmonella*와 같은 식중독균의 오염으로 인한 위해성이 높기 때문에, 적절한 위생화 기술의 이용이 요구되고 있다(5). 일부 연구자들은 이들 식품과 가공품의 위생화를 위해 감마선 조사기술을 이용한 연구를 보고하였는데(6,7), 영양적, 독성학적 안전성 평가에서 바람직한 방법으로 대두됨에 따라 점차 그 이용이 증가할 것으로 기대된다(8,9). 그러나, 조사 식품에 대한 소비자의 선택과 국가간 교역을 명확히 하기 위해 조사된 식품에 대한 표시 및 처리 방법이 표시되어야 한다. 이때 방사선 조사된 식품에 대한 표시가 없을 경우, 이를 신속

하고 정확히 분석할 수 있는 검지법이 확립되어 있지 않다면 소비자의 불신과 국내 시장의 혼란이 예상되므로 조사된 해양 갑각류의 판별을 위한 적절한 분석법의 적용이 요구된다(10,11).

현재까지 개발된 여러 검지법 중, 새우 등의 갑각류에 대한 검지법으로는 electron spin resonance, thermoluminescence analysis, 그리고 방사선에 의해 생성된 새로운 휘발성 hydrocarbon의 분석을 위한 gas chromatography의 이용 등이 소개되어 연구되고 있지만, 분석에 소요되는 시간이 길고 처리할 수 있는 시료의 양이 극히 제한되어 있어 검역처리 절차에서 쉽고 빠르게 이용할 수 있는 분석법의 개발이 요구되고 있다(12).

지금까지 이온화 에너지에 의해 단백질의 구조가 변화된다는 연구 결과들이 보고되면서 대상 식품내 구성단백질의 구조변화를 측정하여 방사선 조사된 식품을 판별하려는 연구들이 진행되어 왔다(13-16). 방사선에 의한 단백질의 변화는 방사선의 직·간접적인 영향에 모두 작용을 받는데, 식품가공에서 사용되는 10 kGy 이하의 흡수선량에서는 주로 간접적인 영향을 받게 된다(17). 방사선에 의한 간접적인 영향, 즉 물의 이온화 및 활성 유리의 작용으로 인해 단백질을 구성

†Corresponding author. E-mail: mwbyun@nanum.kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8060. Fax: 82-42-868-8043

하고 있는 아미노산의 변성 및 파괴로 단백질의 3, 4차 구조가 변하게 된다(14). 이러한 변화는 열변성과 같은 가공방법에서 발생하는 구조적 변성과 다른 형태로 나타날 수 있다(18).

최근, 단백질 항원에 대한 특이항체를 이용한 면역학적 분석법이 단백질의 구조변화를 측정할 수 있는 한 방법으로 인식되면서, 감마선 조사된 식품내 단백질의 항원성 및 구조변화에 대한 연구가 보고되고 있다(19-21). Byun 등(22)의 연구에서 새우의 알러지성을 감소시킬 목적으로 시험한 결과, 감마선 조사된 새우의 근섬유단백질인 tropomyosin(TPM)의 항원성이 변화되는 것을 확인하였으며, 이 결과에서 감마선 조사된 새우의 검지법으로 면역분석법을 적용할 수 있는 가능성을 발견하였다. 방사선 조사식품의 검지법으로서 면역분석법의 적용은 대상항원의 선택이 매우 중요하며, 방사선 조사에 의한 변성이 다른 가공처리에서의 변성과 다른 형태로 진행되는 표적 단백질을 선별하여야 한다(17,18).

본 보에서는 감마선 조사된 새우를 판별하기 위해 열처리에도 매우 안정한 새우의 근섬유 단백질인 TPM을 표적항원으로 하여 감마선 조사와 기타 가공 처리와의 병용 처리된 새우의 검지를 위한 분석법으로 면역분석법의 일종인 항원포획 효소면역분석법(antigen capture enzyme linked immunosorbent assay, sandwich ELISA)의 이용을 평가하고 면역분석법을 감마선 조사된 새우의 검지법으로 이용할 수 있는 기초자료를 마련하였다.

재료 및 방법

항원 분리 및 시료의 준비

지역 수산시장으로부터 냉장 갈색 새우(*Penaeus aztecus*)를 구입하여 본 실험에 사용하였다.

본 연구에 사용된 표적 항원인 갈색 새우의 TPM은 Nagpal 등(23)과 Byun 등(22)의 방법을 이용하여 준비하였다. 즉, 새우를 증류수에서 15분간 삶은 후 껍질과 머리를 제거하고 새우살 100 g에 PBS 완충액(0.01 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.2) 1,000 mL을 가하여 균질하고 4°C에서 하룻밤 교반하였다. 원심분리(9,000×g, 30 min)하여 상등액을 분리한 후 여과한 여액에 (NH₄)₂SO₄를 30% 포화농도가 되게 첨가한 후 원심분리(5,830×g, 20 min)하고, 그 상등액을 취하여 (NH₄)₂SO₄를 60% 포화농도가 되게 첨가하고 다시 원심분리하였다. 원심분리 후 침전된 부분을 PBS 완충액으로 녹인 후 같은 완충액으로 투석하였다. 투석된 용액을 0.1 N HCl 용액을 사용하여 pH 4.5로 보정하고 7,500×g에서 20분간 원심분리하여 isoelectric precipitation 방법으로 단백질을 침전시켰다. 침전물을 PBS 완충액으로 녹인 후 같은 방법으로 3회 isoelectric precipitation을 하였으며, 재침전된 침전물을 다시 PBS 완충액으로 녹인 후 같은 용액에서 투석시켰다. 투석된 용액을 0.22 µm filter를 사용하여 여과한 후 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)를 사용하여 단백질 농도를 측정하고 농도를 1.0

mg/mL로 보정하여 냉장고에 보관하며 표준 항원으로 사용하였다(24).

감마선 조사와 가열 또는 냉동 처리의 병용처리 조건에 따른 TPM의 변화를 비교하기 위해 실험구를 감마선 조사구, 가열 후 감마선 조사구, 감마선 조사 후 냉동처리구로 구분하였다. 새우의 가열 처리는 100°C에서 30분간 삶은 후 냉각하고 진공 포장하여 감마선을 조사하였고, 냉동 처리구는 감마선 조사된 시료를 -20°C 냉동고에서 2개월간 냉동한 후 실험에 사용하였다.

조사 직후 또는 2개월 냉동된 시료로부터 Lee 등(21)의 방법을 이용하여 시료 용액을 조제하였다. 즉, 껍질을 벗기고 머리를 제거한 새우 20 g을 각각 취한 후 0.6 M NaCl을 함유한 PB 완충액(pH 7.0) 200 mL을 가하고 균질기(Diex 900, Heidolph, Germany)로 균질화하였다. 균질물을 4°C에서 2시간 동안 교반한 후 원심분리(9,000×g, 30 min)하여 상등액을 여과한 다음 그 여액을 시료 용액으로 하여 용액내 TPM의 양을 Sandwich ELISA를 이용하여 정량하였다.

항체의 준비

Jeoung 등(25)의 연구에서 사용된 mouse 단클론항체(mAb 4.9.5, M-IgG)를 사용하였고, TPM에 대한 다클론항체(P-IgG)는 Lee(18)의 방법으로 토끼에서 생산된 항체를 사용하였다.

감마선 조사

감마선 조사는 Co-60을 선원으로 하여 시간당 10 kGy의 선량율로 시료가 3, 5, 7, 10 kGy의 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량의 확인은 ceric/cerous dosimeter를 사용하였고(26), 흡수선량의 오차는 ±0.1 kGy였다. 이때 조사실의 온도는 10°C였다.

Sandwich ELISA를 이용한 TPM의 정량

시료 용액에 존재하는 TPM의 양을 정량하기 위해 Jeoung 등(25)의 방법을 약간 수정한 sandwich ELISA를 실시하였는데, 이 방법은 각기 다른 항원결정기(epitope)를 가진 두 개의 항체를 이용하여 항원을 포획하여 정량하는 방법이다. 즉, M-IgG를 basic coating buffer(0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하여 0.01 µg/mL의 농도로 희석한 후 100 µL를 polystyrene flat-bottom microtiter plates(Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 well에 고정시켰고, 1%의 bovine serum albumin(BSA) 용액 120 µL를 첨가하여 blocking시킨 다음, 시료 용액과 표준 TPM 용액을 각각의 well에 100 µL 첨가하고 반응시켰다. 그 후 0.1 µg/mL로 희석한 P-IgG 용액 100 µL를 첨가하여 M-IgG와 결합한 TPM과 반응시킨 다음, goat anti-rabbit IgG에 horseradish peroxidase(HRP, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)를 공액결합한 2차 항체를 0.1 µg/mL의 희석 농도로 100 µL씩 well에 첨가하였다. 0.04% o-phenylenediamine(OPD, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 기질용액을 사용하여 발색을 유도하고 2.0 M H₂SO₄ 용액으로 반응을 종

결시킨 후 492 nm로 고정된 ELISA Reader(CERES UV-900C, BIO-TEK Instruments Inc., NY, USA)에서 흡광도를 측정하여 TPM의 정량을 위한 표준곡선을 작성하였고, 이 곡선에서 얻은 함수를 이용하여 각 시료 용액에 존재하는 TPM을 정량하였다. 각 단계별 반응 후 well을 0.05%(v/v) Tween 20을 함유한 PBS 완충액(PBST)으로 3회 세척하였고 coating을 제외한 모든 반응은 37°C에서 90분간 실시하였다.

결과 분석

표준곡선은 동일한 항원농도와 항체의 농도로 5회 반복 실시하여 얻어진 값을 SAS[®] software(27)에서 프로그램된 general linear procedures, least square 평균값을 Duncan의 multiple range test법을 사용하여 평가하여 0.01% 내에서 유의성을 검정하였다. TPM의 정량은 같은 처리조건의 시료 5개의 평균값을 구하였고, 4회 반복 실험하여 $p < 0.05$ 의 오차 한계에서 유의성을 평가하였다.

결과 및 고찰

TPM 정량을 위한 Sandwich ELISA 확립

감마선 조사된 새우의 신속한 판별을 위한 방법으로 면역분석기법 중 Sandwich ELISA를 이용하기 위해 두 가지 항체를 사용하는 분석법을 확립하였다. 이 방법은 단클론 항체를 포획 항체로 사용하여 microwell에 coating한 후 항원을 포획하는 방법으로 미량성분의 검출 및 의학적 진단법으로 넓게 사용된다(24,28). TPM의 정량을 위해 M-IgG와 P-IgG의 희석 농도를 다르게 조정하여 표준 정량 곡선을 작성하였을 때, M-IgG가 0.01 µg/mL, P-IgG가 0.1 µg/mL의 희석 농도일 때 시료에 존재하는 TPM의 정량을 위한 최적 검출범위가 얻어졌다(Fig. 1). TPM의 검출한계는 0.01 µg/mL이었고, 이 조건에서 TPM은 12.50에서 50.00 µg/mL의 농도 범위에서 검출될 수 있으며, 이때 TPM의 농도는 아래의 함수에서와 같이 지수의 승과 비례한다. 지수의 승을 함수식에서 얻은 것과 같이 시료에 존재하는 TPM의 농도는 Sandwich ELISA에서 얻어진 흡광도(y)와 y 절편 0.9747의 값을 검출범위의 직선의 기울기 0.426으로 나눈 값으로 이 식을 이용하여 시료에 존재하는 TPM을 정량할 수 있었다.

$$x = e^{(y - b)/a}$$

x : TMP의 농도(µg/mL)

y : OD value at 492 nm

b : y 절편

a : 최적 검출범위내 직선의 기울기

위 검출한계는 매우 우수한 것으로 좁은 농도범위를 좀 더 정확하게 측정할 수 있기 때문에 항원의 존재 유무와 정량에 매우 유용할 것으로 판단된다(29). 일반적으로 면역분석법의 검출한계는 사용되는 항체에 의존하기 때문에 정확한 항

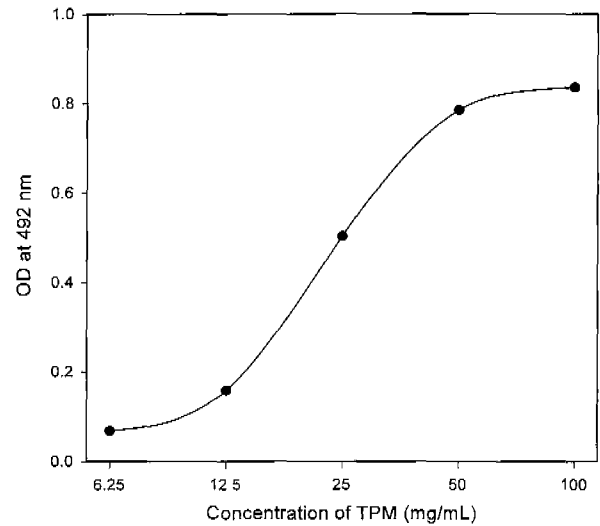


Fig. 1. Standard curve of Sandwich ELISA for quantifying shrimp tropomyosin (TPM).

Mouse monoclonal IgG (0.01 µg/mL) was used as a coating Ab for capturing TPM and rabbit polyclonal IgG (0.1 µg/mL) was used as a reaction Ab against captured TPM. TPM was serially double-diluted from 100 to 6.25 µg/mL and optimal detection range was obtained in the range of 12.5 to 50 µg/mL.

원의 정량과 항원의 특성을 이해하기 위한 연구에서는 항체의 친화성과 항원결정기에 의존성이 높은 항체가 사용되어야 한다(30). 본 연구에서 사용된 두 항체는 모두 높은 항원 친화성을 가지고 있는 것으로 판단되었으며, 특히 M-IgG의 경우 P-IgG보다 10배 정도 높은 친화성을 가지고 있는 것으로 나타나, 단클론항체의 이용은 시료에 존재하는 항원의 정확한 정량을 위해 그 이용성이 높다고 할 수 있겠다(28).

감마선 조사된 새우의 TPM 정량

Table 1은 감마선 조사와 가열 또는 냉동 처리된 새우로부터 추출한 시료 용액에 존재하는 TPM의 양을 Sandwich ELISA로 정량한 결과이다. 모든 처리구에서 감마선 조사에 의해 TPM의 양이 감소되는 것으로 나타났으며, 그 감소는 흡수선량에 의존하는 것으로 나타났다(Table 1). 본 연구에서 사용된 M-IgG가 인식하는 epitope은 감마선 조사에 매우 민감한 것으로 나타났고, 선량별 차이도 유의적으로 나타났다. 감마선 조사에 의한 단백질의 구조적 변화는 많은 연구에서 이미 보고되고 있으며(20-22), 단백질 특성에 따라 선량 의존도가 다르게 나타난다(23).

처리구별 검출량의 감소는 감마선 조사구에서 -2.301, 가열 후 감마선 조사구에서 -2.183, 그리고 감마선 조사 후 냉동 처리구에서 -1.650의 기울기를 나타냈고(Fig. 2), 가공처리에 의해 비조사구에서 TPM은 38.91 µg/mL이 검출되었는데 반해, 가열처리(34.78 µg/mL)나 냉동(25.45 µg/mL)에 의해서 검출되는 양이 감소되는 것으로 나타났다.

이 결과는 비록 새우의 TPM이 열에 매우 안정하여 가열 처리에 의해 분자 특성이 크게 영향을 받지 않으나(23), 시료에 대한 가열처리시 대부분의 단백질이 불용화되고 분자간

Table 1. Detected concentration ($\mu\text{g/mL}$) of tropomyosin of shrimps using a Sandwich ELISA¹⁾ following gamma irradiation in combination with heating or freezing

Treatments	Irradiation dose (kGy)				
	0	3	5	7	10
Irradiation	38.91 \pm 1.38 ⁴⁾	32.29 \pm 0.82	27.62 \pm 1.24	22.95 \pm 2.53	15.95 \pm 2.36
Heating ²⁾ and irradiation	34.78 \pm 0.96	30.26 \pm 1.32	26.43 \pm 1.17	19.13 \pm 1.62	13.91 \pm 1.69
Irradiation and freezing ³⁾	25.45 \pm 1.72	20.36 \pm 1.06	16.29 \pm 2.82	13.23 \pm 0.76	9.16 \pm 1.51

¹⁾Sandwich ELISA was formatted with two different types of IgG produced against shrimp tropomyosin for capturing intact antigen.

²⁾Heating was done at 100°C for 30 min and samples were irradiated and tested.

³⁾Samples were irradiated, frozen at -20°C for 2 months and then tested.

⁴⁾Mean \pm SD (n=4).

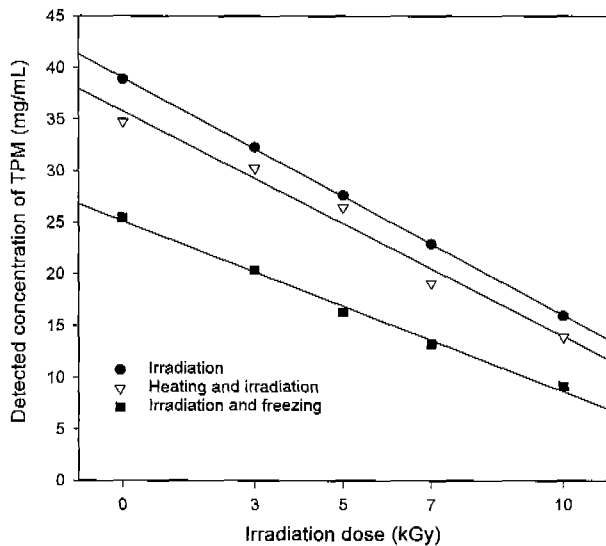


Fig. 2. Regression curves on decrease rates of shrimp tropomyosin (TPM) by gamma irradiation. TPM in the solution prepared from sample was detected by Sandwich ELISA.

응집현상 등으로 인해 TPM의 용해성을 다소 감소시키는 것으로 사료된다.

감마선 조사 후 동결은 TPM을 더욱 심하게 변성시키는 것으로 나타났다. 일반적으로 단백질은 냉동에 크게 영향을 받지 않으나, 동결 온도와 기간 등에 의해 조직 내 수분의 결정화 및 재결정화에 의해 구성 단백질이 영향을 받을 수 있다(31). 새우의 TPM과 같은 모양을 갖고 있는 myosin의 sub-fragment인 myosin S-2와 light meromyosin의 경우 동결에 의해 구조적으로 쉽게 변성되는 것으로 보고되고 있고(18,32), 본 연구의 결과도 선형 단백질인 TPM이 동결에 의해 영향을 받아 감마선 조사와는 관계없이 일부 변성이 진행된 것으로 판단된다. 즉, 감마선 조사가 TPM을 구조적으로 변성시키는 것을 확인할 수 있었으나, 가열과 냉동 등의 병용처리에 의해서도 변성이 진행되는 것을 알 수 있었다(Table 1). 특히, 동결에 의한 변성이 매우 심하게 발생되어 동결된 비조사구의 경우 TPM의 검출량이 5~7 kGy의 감마선을 조사한 감마선 조사구의 TPM의 양을 나타내기 때문에 본 연구에서 사용된 MAb 4.9.5 항체를 이용한 Sandwich ELISA법의 적용은 어렵다고 판단된다.

면역분석기법을 이용한 감마선 조사된 식품의 검지를 위한 분석법의 개발은 조사에 의한 특정 항원의 구조변화로 일어나는 항체의 항원 인식 정도가 다르게 나타나는 원리를 이용하는 것이므로, 이를 명확하게 나타낼 수 있는 항체의 생산이 무엇보다 중요하다. 즉, 선량간 유의적인 차이가 발견되어야 하며, 빠른 분석과 정확한 결과의 도출은 사용되는 항체에 의존한다. 또한, 방사선 조사와 다양한 가공방법이 병용 처리된 시료에 대한 검지는 위의 결과(Table 1)에서도 알 수 있듯이 방사선 조사에 의해서만 변성되는 항원과 그 항원에 대한 특이 항체의 이용이 필수적이다. 따라서 다클론 항체보다는 단클론 항체의 사용이 요구되며, 실제로 다클론 항체가 감마선 조사된 단백질의 구조변화를 인식하지만 선량에 맞게 차별적인 결과를 도출하지 않은 연구결과들도 있다(20). 최근 연구보고에서 감마선 조사된 식품의 검지 기술로서 다클론 항체를 이용한 ELISA법을 소개하였으나(33), 선량간 유의적인 차이가 두드러지지 않았으며, 분석시 많은 전처리 공정에서 이미 항원이 변성될 가능성이 높다. 따라서 면역분석기법을 사용할 경우, 항원-항체 반응의 특이성과 우수성을 높이기 위해서는 대상 식품내 표적 항원의 탐색이 매우 중요하며, 감마선 감수성을 미리 측정하고, epitope의 선별과 특이성이 높은 우수항체의 생산이 중요하다(11). 위 결과에서도 알 수 있듯이 가공공정 중에도 항원은 변성될 수 있기 때문에 가공공정에 의해 발생하는 항원의 변성을 미리 감안하여 결과를 도출할 필요가 있다.

새우 TPM에 대한 특이성이 높은 두 항체를 사용하여 항원을 포획하는 방법인 Sandwich ELISA를 이용하였을 때, 감마선 조사된 새우를 판별할 수 있는 면역분석기법의 기초 자료를 확보할 수 있었다.

요 약

감마선 조사된 새우의 신속한 판별을 위한 방법으로 갈색 새우의 TPM을 항원으로 하여 개별적으로 생산된 M-IgG와 P-IgG를 이용한 Sandwich ELISA를 분석법으로 확립하였다. M-IgG를 항원 포획을 위한 coating 항체로 사용하고, P-IgG를 포획된 TPM에 대한 반응항체로 사용하였을 때, 12.5에서 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서 TPM을 정량할 수 있었다. 감마선 조사된 새우의 TPM 농도는 선량에 의존하며 감소하

였고, 감마선 조사와 가열 또는 냉동 등의 병용 처리에서도 선량에 의존하며 감소하였다. 이 결과는 면역분석기법의 하나인 Sandwich ELISA가 감마선 조사된 새우의 검지법으로 이용될 수 있다는 가능성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 원자력 중장기 연구개발과제의 지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

문헌

- Thayer, D.W. : Wholesomeness of irradiated foods. *Food Technol.*, **48**, 132-135 (1994)
- Olson, D.G. : Irradiation of food. *Food Technol.*, **52**, 56-62 (1998)
- Loaharanu, P. : International developments of food irradiation and consumer acceptance of irradiated food. *Food Sci. Ind.*, **31**, 11-18 (1998)
- IAEA : Irradiation of fish, shellfish and frog legs. A compilation of technical data for authorization and control. IAEA-TECDOC-1158 (2000)
- Farkas, J. : Microbiological safety of irradiated foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **9**, 1-15 (1989)
- Lacroix, M.L., Jobin, M., Latreille, B., Nouchpramool, K. and Gagnon, M. : The effect of gamma irradiation on physical and nutritional quality of *Penaeus monodon* shrimp. *Radiat. Phys. Chem.*, **46**, 731-737 (1995)
- Ito, H., Rashid, H., Sangthong, N., Adulyatham, P., Rattagool, P. and Ishigaki, I. : Effect of gamma irradiation on frozen shrimps for decontamination of pathogenic bacteria. *Radiat. Phys. Chem.*, **42**, 279-282 (1993)
- WHO : High dose irradiation-Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. WHO Technical Report Series-890 (1999)
- Byun, M.W., Lee, J.W., Yook, H.S., Lee, K.H., Kim, K.P. and Lee, C.H. : Harmonized regulations for international trade of irradiated food in Asia and Pacific regions. *Food Sci. Ind.*, **32**, 82-87 (1999)
- Delincee, H. : Detection of food treated with ionizing radiation. *Trends Food Sci. Technol.*, **9**, 73-82 (1998)
- WHO/HPP/FOS. : Review of the safety and nutritional adequacy of irradiated food. World Health Organization. *Organisation Mondiale De La Sante*. Provisional edition, p.24-25 (1992)
- Ehlermann, D.A.E. : The contribution of analytical detection methods to the enforcement of good irradiation practice. In *Detection Methods for Irradiated Foods*, McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R. and Pearce, J. (eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p.14-19 (1996)
- Al-kahtani, H.A., Abu-tarbooch, H.M., Atia, M., Bajaber, A.S., Ahmed, M.A. and El-mojaddidi, M.A. : Amino acid and protein changes in tilapia and spanish mackerel after irradiation and storage. *Radiat. Phys. Chem.*, **51**, 107-114 (1998)
- Filali-mouhim, A., Audette, M., St-Louis, M., Thauvette, L., Denoroy, L., Penin, F., Chen, X., Rouleau, N., Le Caer, J.P., Rossier, J. Potier, M. and Le Maire, M. : Lysozyme fragmentation induced by γ -radiolysis. *Inter. J. Rad. Biol.*, **72**, 63-70 (1997)
- Kume, T. and Matsuda, T. : Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **46**, 225-231 (1995)
- Karam, L.R. and Simic, M.G. : Detection of irradiated food : Use of hydroxyl radical biomarkers. *Anal. Chem.*, **60**, 1117-1119 (1988)
- Tzaphlidou, M., Kounadi, E., Leontiou, I., Matthopoulos, P. and Glaros, D. : Influence of low doses of γ -irradiation on mouse skin collagen fibrils. *Int. J. Radiat. Biol.*, **71**, 109-115 (1997)
- Lee, J.W. : Application of immunoassay for monitoring conformational changes of myosin under physico-chemical treatment. *Ph.D. Dissertation*, Kon-Kuk University, Korea (1999)
- Kume, T., Ishii, T. and Matsuda, T. : Immunochemical identification of irradiated chicken eggs. *J. Sci. Food Agric.*, **65**, 1-4 (1994)
- Lee, J.W., Kim, J.H., Yook, H.S., Kang, K.O., Lee, S.Y., Hwang, H.J. and Byun, M.W. : Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J. Food Prot.*, **64**, 272-276 (2000)
- Lee, J.W., Yook, H.S., Lee, K.H., Kim, J.H., Kim, W.J. and Byun, M.W. : Conformational changes of myosin by gamma irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **58**, 271-277 (2000)
- Byun, M.W., Kim, J.H., Lee, J.W., Park, J.W., Hong, C.S. and Kang, I.J. : Effects of gamma irradiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J. Food Prot.*, **63**, 940-944 (2000)
- Nagpal, S.L., Rajappa, S.L., Metcalfe, D.D. and Subba Rao, P.V. : Isolation and characterization of heat stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*). *J. Allergy Clin. Immunol.*, **83**, 26-32 (1989)
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. : Measurement of protein using bicinonic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85 (1985)
- Jeoung, B.J., Reese, G., Hauck, P., Oliver, J.B., Daul, C.B. and Lehrer, S.B. : Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **100**, 229-234 (1997)
- Holm, N.W. and Berry, R.J. : *Manual on Radiation Dosimetry*. Marcel Dekker Inc., New York, USA (1970)
- SAS : SAS/STAT : *User's Guide*. 6th edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (1988)
- Sargeant, J.G., Bowre, H.M. and Billington, M.J. : Determination of papain in raw meat by immunoassay. *Meat Sci.*, **34**, 39-47 (1993)
- Dincer, B., Spearow, J.L., Cassens, R.G. and Greaser, M.L. : The effect of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. *Meat Sci.*, **20**, 253-265 (1987)
- Jones, S.J. and Patterson, R.L.S. : Double-antibody ELISA for detection of trace amount of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci.*, **15**, 1-13 (1985)
- Petrovic, L., Grujic, R. and Petrovic, M. : Definition of optimum freezing rate-2. Investigation of the physico-chemical properties of beef *M. longissimus dorsi* frozen at different freezing rates. *Meat Sci.*, **33**, 319-331 (1993)
- Wagner, J.R. and Añon, M.C. : Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. II. Influence on solubility, viscosity and electrophoretic behaviour of myofibrillar proteins. *J. Food Technol.*, **21**, 547-558 (1986)
- Lee, K.A., Choi, Y.J. and Yang, J.S. : Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of irradiated eggs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 1030-1034 (2000)

(2001년 4월 11일 접수)