

가공식품 중 고등어의 검출을 위한 ELISA의 개발

손동화* · 김미혜
한국식품연구원

Development of Sandwich ELISA for the Detection of Mackerel in Processed Foods

Dong-Hwa Shon* and Mi-Hye Kim
Korea Food Research Institute

Abstract There have been few studies related to ELISA for mackerel. In this study we developed a sandwich ELISA for mackerel in processed foods using rabbit polyclonal antibodies against mackerel parvalbumin, the major allergen of mackerel and heat-stable protein. The parvalbumin was purified by ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-50 column chromatography. From the standard ELISA curves, the detection limit of parvalbumin was 3 ng/mL and the detection range of mackerel was 5-5,000 µg/mL. We further investigated the cross-reactivity of the antibodies toward mackerel, mackerel pike, salmon, flatfish, armorclad rockfish, cod fish, squid, shrimp, blue crab, and lobster. The antibodies were specific for mackerel only. The mean assay recoveries in cooked cream soup, baby food, sausage, and sauce spiked with 0.01 to 0.3% mackerel were 104, 101, 54, and 0%, respectively. In sample tests of 16 commercial items, the qualitative coincidence ratio of assay result and indication was 75%.

Keywords: mackerel parvalbumin, polyclonal antibodies, sandwich ELISA, processed foods

서 론

식품 알레르기는 식이형태로 생체에 들어 온 특성의 단백질(알레르겐)에 대하여 면역계가 과잉으로 반응하여 생산된 특이IgE항체가 비만세포(mast cell)에 결합된 상태에서 재차 침입한 알레르겐과 반응하여 히스타민 등의 염증매개물질을 분비함으로써 생기는 이상 현상으로 주로 영유아에게 문제를 야기하고 있으며, 심한 경우에는 목숨을 잃을 수도 있다(1-3).

이러한 식품 알레르기는 날로 증가해 전 국민의 20-25%가 그 증상을 자각하고 있으며 성인의 1-2%, 영유아의 6-8%에서 증상이 확인되고 있다. 특히 소아의 아토피성 피부염의 35%, 소아 천식의 10%가량이 식품 알레르기에 의한 것으로서, 식품 알레르기는 더 이상 방치할 수 없는 중대한 질환 중 하나이다(4-6).

많은 식품 알레르기의 원인물질(알레르겐)은 대부분 단백질로서 현재까지 700여종에 대한 아미노산 서열이 밝혀져 있으며, 그 중에서도 동양인에 있어서 계란이 50%, 우유 및 유제품이 25%, 어류가 6% 정도인 것으로 알려져 있다(7). 그 외에도 사람의 체질에 따라서 여러 종류의 식품들이 알레르기를 유발할 수 있고 개인에 따라 매우 민감하게 특정식품에 반응하므로 표시대상은 함유된 양과 관계없이 원재료명을 의무적으로 표시하여 소비자에게 정보를 제공하여야 한다(8,9).

이에 따라 식약청에서는 2003년부터 가공식품 중 식품 알레르겐의 표시를 의무화하고 있다. 최근에는, ‘난류(가금류), 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토’ 등 12종이 표시대상으로 선정되었다(10). 그러나 가공식품 알레르겐의 함유여부를 검사할 수 있는 공식적인 방법이 정해져 있지 않아서, 그 검출법을 확립함으로써 실제 식품 시료 중에 해당 알레르겐의 함유유무를 판단할 수 있도록 하여야 할 필요가 있다.

현재 가공식품 중 알레르기 유발 원료가 함유되었는지를 검출하는 방법은 크게 둘로 나누면, 특이항체를 이용하는 방법(면역분석법)과 특이적인 DNA 염기서열을 검출대상으로 하는 방법(PCR)이 있다(11,12). 한편, 통상적인 방법인 킬달, 전기영동법, 아미노산분석법, HPLC 등 비특이적인 방법은 정량성이 떨어지거나 식품 중 여러 성분의 혼합으로 인하여 검출이 매우 어려운 실정이다. 면역분석법을 세분하면 ELISA, immunoblotting, immunostrip 등이 있으나, 그 중에서도 항원-항체의 반응을 비교적 손쉽고 효과적으로 분석할 수 있는 ELISA가 가장 널리 이용된다(12).

기존 연구에서 가공식품 중 우유, 계란, 땅콩, 대두, 밀, 메밀, 아몬드, 헤이즐넛, 게, 새우 등 갑각류와 돼지고기 검출을 위한 ELISA 분석법이 개발된 바 있다(12-15). 그러나 표시대상 식품 알레르겐 12종 가운데 고등어에 대한 ELISA 검출법은 아직까지 국내외적으로 보고되지 않은 실정이다. 다만, 가공식품 중 생선 알레르겐의 검출을 위하여 대구 등 생선이나 개구리의 parvalbumin에 특이항체를 이용한 ELISA 개발에 관한 연구보고가 있었다(16-19). 특히, parvalbumin은 생선류의 주요 알레르겐으로써 모든 생선에 공통적으로 존재하고 잘 보존되어 있는 근형질 단백질이고, 물에 잘 녹고, 분자량은 약 12 kDa, pI는 4, 칼슘과 결합하는 부위를 갖고 있음이 보고되었다(20). 그러므로 항 parvalbumin 항체를 이용한 면역분석법은 교차반응에 의하여 여러 종류의 생선류

*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 26, 2011; revised July 26, 2011;
accepted November 16, 2011

검출은 가능하였지만, 고등어만을 특이적으로 검출하는 것은 곤란하였다. 그 외 연구보고는 주로 식품 알레르기 환자의 혈청 중 생선 알레르겐에 대한 특이항체의 존재를 확인하고, 그 항체가 다른 생선 단백질들과 반응성(교차반응)에 대한 것 등이었다(21-24).

따라서 본 연구에서는 알레르기 원인식품의 하나인 고등어가 가공식품 중에 존재하는지를 손쉽게 확인할 수 있도록 ELISA 검출법을 개발하고자 하였다. 즉, 고등어로부터 parvalbumin을 분리, 정제하고 실험동물에 면역하여 고등어에 대하여만 매우 높은 특이성을 나타내는 항체를 생산하고, 이를 이용하여 ELISA 조건을 확립하였으며 spike test 및 실제 가공식품 중 고등어를 검출하는데 ELISA 검출법을 적용하였다.

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, cabornate-bicarbonate buffer, horseradish peroxidase(HRP), monoclonal anti-frog parvalbumin antibody 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. ELISA를 위한 항 고등어 parvalbumin 항체 및 특이항체-효소 결합물은 자체적으로 제작한 것을 사용하였다. New Zealand White 종 토끼는 한림실험동물(Pyeongtaek, Gyeonggi, Korea)로부터 구입하였으며, microplate는 Nunc사(Roskilde, Denmark)의 Maxisorp™를, microplate reader는 Molecular Devices 사(Sunnyvale, CA, USA)의 ThermoMax™를 사용하였다. 생선류와 가공식품류 시료는 2008년 성남시 분당소재 할인매장에서 구입하였고, 특히 후자의 경우 국내 및 국외 제품 중 단순 가공품 3종, 우동소스 6종, 일반소스 2종, 크립스프 2종, 이육식 2종, 총 16점을 무작위로 확보하여 실험에 사용하였다.

고등어 parvalbumin의 정제

고등어(*Scomber japonicus*)의 근육조직에 2배(v/v)의 추출완충액(0.1 M tris(hydroxymethyl) aminomethane/0.5 M glycine buffer (pH 8.7)/1 mM dithioerythriol(DTE))을 첨가하고 균질화한 후 45°C, shaking water bath에서 하룻밤 교반하였다(16). 이를 4°C, 18000×g에서 15분간 원심분리하였다. 그 상정액을 회수하여 30분간 교반하면서 끓였다. 그 후 4°C, 4000×g에서 10분간 원심분리하고 상정액을 회수하여 상온에서 55% 암모늄침전을 실시하였다. 다시 4°C, 4000×g에서 25분간 원심분리하고 상정액을 회수하여 상온에서 90% 암모늄침전을 실시한 후, 한번 더 4°C, 9000×g에서 25분간 원심분리하였다. 침전물을 회수하여 50 mM Tris(pH 8.0)/1 mM DTE로 재현탁시켜 Sephadex G-50을 이용한 size exclusion chromatography를 행하였다. 이때 얻은 분획에 대하여 항 개구리 parvalbumin 항체를 이용한 ELISA를 실시하여 교차반응한 고등어 parvalbumin의 존재를 확인하고 이들 주요 분획만을 모아서 3차 증류수에 투석하고 동결건조한 후 실험에 사용하였다. 또한 분리정제된 parvalbumin의 분자량 및 순도 확인을 위하여 Laemmli 방법(25)에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다.

특이항체의 생산

토끼의 등 피부에 마리 당 500 µg의 parvalbumin 용액과 Freund's complete adjuvant를 1:1로 혼합한 유탁액 1 mL을 피하주사

하였다. 이어서 2주 간격으로 3차례 추가면역을 실시하였다. 다만, 이 때에는 adjuvant로써 Freund's incomplete adjuvant를 사용하였다. 매 면역 일주일 후, 토끼의 귀 정맥으로부터 채혈하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리(3,000 rpm, 20 min)하여 항혈청을 분리하였다(26). T-Gel™ Purification Kit(Pierce Co., Rockford, IL, USA)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 항혈청으로부터 항체를 정제한 후, PBS에 대하여 투석하여 사용하였다.

특이항체-효소 복합물의 제조

항 parvalbumin 항체-효소 결합물(anti-parvalbumin antibody-HRP conjugate)을 다음과 같이 제조하였다. HRP 2 mg과 sodium periodate 21.4 mg을 증류수 1.1 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 용액의 pH를 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 반응시킨다. 반응 후 0.1 M sodium tetrahydroborate 100 µL를 첨가해 4°C에서 2시간동안 반응시킨 후 회수하여 PBS에 대하여 투석하고 사용하였다.

시료의 처리

식품 시료의 추출을 위하여 1 g의 시료에 4 mL의 PBS를 넣고 균질화한 다음 70°C, 10분간 가열하였다. 이를 10,000×g에서 20분간 원심분리하고 상정액을 회수하였다. 이를 다시 PBST로 5배(v/v) 희석하여 분석에 사용하였다.

샌드위치 ELISA(sELISA)

정제한 항 parvalbumin 항체를 coating buffer(0.1 M sodium carbonate buffer, pH9.0)에 2 µg/mL의 농도로 희석하여 microplate에 각 well 당 100 µL씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 정지하였다. 이후 통상의 blocking 과정을 생략하고 washing buffer(phosphate buffered saline with Tween 20, PBST; 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 내에서 항원항체반응을 유도하였는데, 이는 Tween 20의 존재에서 비특이적인 반응이 억제되었기 때문이다(27). 즉, coating 과정이 끝난 각 well을 200 µL의 washing buffer로 세번 세척한 다음, 시료용액을 각 well 당 100 µL씩 첨가하고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 washing buffer로 앞에서와 같이 세척한 다음 항 parvalbumin 항체-효소 결합물을 PBST로 1/100로 희석하고 well 당 100 µL씩 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 이후, washing buffer로 세척한 다음, well 당 100 µL의 기질 용액(0.01% TMB in phosphate-citrate buffer, pH 5.0 with 0.002% H₂O₂, 사용 직전에 준비)으로 상온에서 30분 동안 발색시킨 후, 2 M H₂SO₄를 50 µL씩 각 well에 넣어 발색 반응을 중지시켰다. 이어서 microplate reader로 흡광도(A₄₅₀)를 측정하였다. 모든 시료는 3반복 처리하여 얻은 평균값을 사용하였다.

특이항체의 교차반응

항 고등어 parvalbumin 항체의 수산식품 단백질 몇 종에 대한 반응성을 조사하였다. 즉, 고등어, 우럭, 대구, 연어, 광어, 꽂치, 오징어, 새우, 꽃게, 바다가재 등을 70°C, 10분간 열처리한 다음, 시료처리 방법에 따라 준비한 각기 여러 농도의 시료용액에 대하여 sELISA를 실시하였다. 본 연구에서 특이항체의 교차반응을 얻은 다음 식에 의하여 구하였다.

Cross-reactivity (%)

$$= (C_{A450=1/2max} \text{ of mackerel parvalbumin} / C_{A450=1/2max} \text{ of fish}) \times 100$$

단, 여기에서 $C_{A450=1/2max}$ 은 sELISA의 수치(A_{450})가 최고발색치의 50%를 나타낼 때의 시료 농도를 나타냄.

고등어 parvalbumin의 열안정성 조사

고등어 분쇄물을(1% in PBS)을 25, 60, 80, 100, 121°C에서 각각 10분간 열처리하고 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상정액에 대하여 sELISA를 실시하였다.

이때 고등어 parvalbumin의 열안정성은 처리온도별 반응율을 기준으로 판단하였으며, 다음 식에 의하여 구하였다.

Reactivity (%)

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

단, 여기에서 $C_{A450=1/2max}$ 은 sELISA의 수치(A_{450})가 최고발색치의 50%를 나타낼 때의 시료 농도를 나타냄.

검출법의 신뢰성 검정 및 시판시료의 분석

ELISA 검출법의 신뢰성을 검정하기 위하여 spike test를 실시하였다. 즉, 몇 종의 가공식품(크림수프, 이유식, 소시지 등)에 고등어를 첨가하고, 그 중에 함유된 고등어의 함량을 sELISA로 분석하였다. 최종 100-3,000 ppm(0.01-0.3%)의 고등어 첨가 시료를 70°C, 10분간 열처리한 다음, PBS를 4배 첨가하고 균질화하여 추출하고, 이를 다시 PBST로 5배 희석하여 sELISA를 실시하였다. 따라서, sELISA 분석치에 희석계수(5×5=25)를 곱하여 시료중의 농도를 구하였다. 다시 이 수치를 각기 첨가한 parvalbumin의 함량(0.2-6 ppm(고등어 함량×1/500))과 비교하여 분석 회수율을 구하였다.

한편 본 연구에서 개발한 sELISA를 이용하여 위와 동일한 방법으로 시판 시료 16점의 고등어 검출을 실시하였다.

결과 및 고찰

고등어 단백질의 정제 및 특이항체의 생산

고등어의 parvalbumin을 면역원으로 사용하고자 ‘재료 및 방법’에 따라 분리, 정제하였다. Sephadex G-50을 이용한 chromatography의 결과, Fig. 1과 같은 크로마토그램을 얻었다. 이때 얻은 분획에 대하여 항 개구리 parvalbumin 단클론항체의 교차반응을 ELISA로 조사함으로써 parvalbumin의 존재를 확인하였다(17). 또한 그 주요 분획들의 SDS-PAGE 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2B(lane 3)에서는 최종적으로 분리된 parvalbumin의 band가 약 12 kDa에서 확인되었다. 이와 같이 얻어진 parvalbumin을 면역하여 항체를 생산하였을 때 추가 면역을 실시할수록 대체로 높은 항체가를 나타내어 4차 혈청을 정제하여 얻은 특이항체를 ELISA 분석용으로 사용하였다(자료 미제시). 또한 정제한 특이항체에 HRP를 공유결합시킴으로써 항체-HRP 복합물을 준비하였다.

ELISA format의 최적화 및 교차반응

특이항체와 항체-HRP복합물을 이용하여 고등어의 주요 알레르겐(parvalbumin, 12 kD)을 분석하기 위한 ELISA의 최적조건을 검토하였다. 우선 ELISA format을 검토하였는데 간접형합

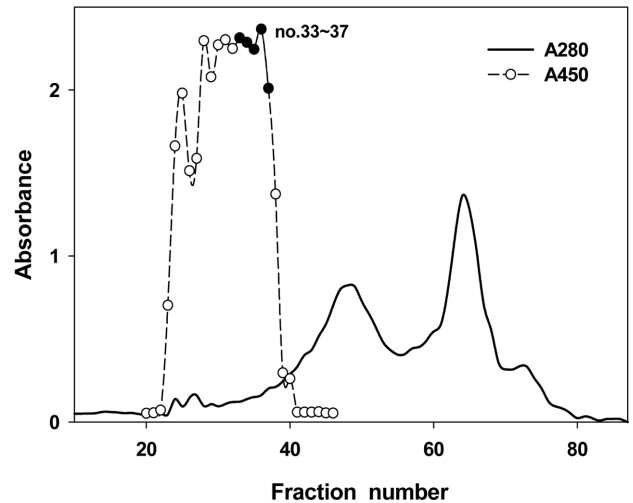


Fig. 1. GPC pattern of parvalbumin from mackerel protein extract by Sephadex G-50 column chromatography. A_{280} of each fraction was monitored for protein and A_{450} was for parvalbumin by ELISA. Fractions 33-37 were pooled for the purified parvalbumin.

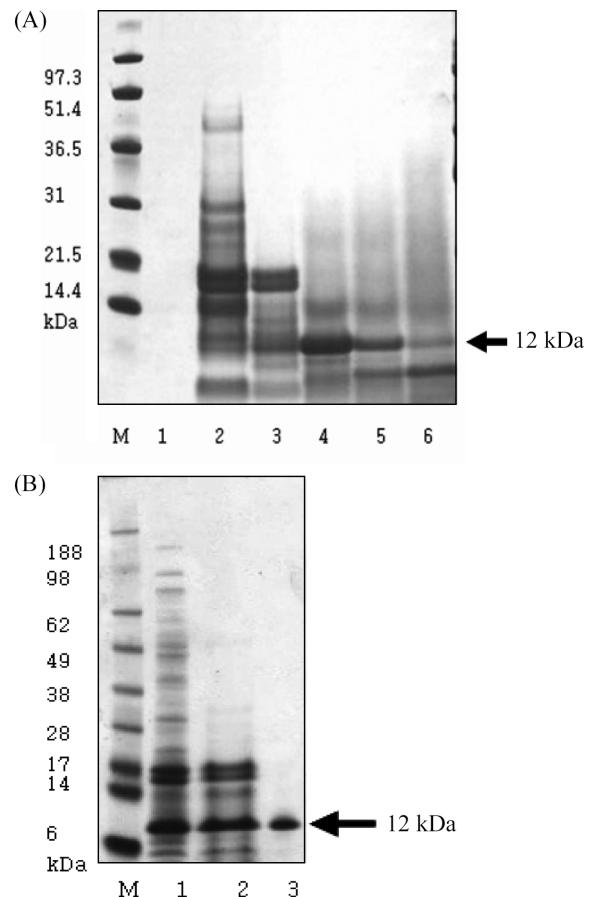


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of mackerel parvalbumin. (A) Lanes M: markers, 1: fraction no. 23, 2: fraction no. 24, 3: fraction no. 28, 4: fraction no. 36, 5: fraction no. 38, 6: fraction no. 40. (A) fractions from GPC in Fig. 1. (B) Lanes 1: crude extract, 2: precipitate from 55% ammonium sulfate treatment, 3: purified parvalbumin after gel filtration. Arrow indicates parvalbumin (12 kDa).

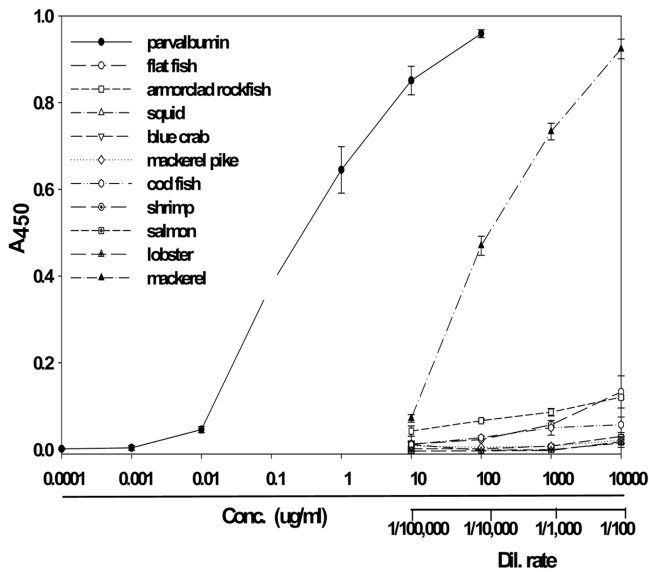


Fig. 3. Reactivity of anti-mackerel parvalbumin antibody towards heated seafoods when determined by sELISA.

ELISA(competitive indirect ELISA, ciELISA), 직접경합 ELISA(competitive direct ELISA, cdELISA), 샌드위치 ELISA(sandwich ELISA, sELISA)의 조건하에서 얻은 표준곡선을 비교한 결과, 고등어 parvalbumin의 검출한계는 각각 200, 300, 3 ng/mL로써 검출감도가 가장 우수한 format은 sELISA로 나타났다(자료 미제시). ELISA에서 표준곡선에 사용되는 표준시료는 결과에 큰 영향을 미치는데(28), 본 연구에서는 고등어의 주요 알레르겐인 parvalbumin과 전체 고등어 생살을 기준으로 표준곡선을 나타내었다(Fig. 3). 여기에서 parvalbumin의 검출범위는 10-1000 ng/mL(ppb)로 매우 민감한 검출이 가능함을 알 수 있었다. 또한, 이로부터 고등어(생살)의 검출범위는 5-5,000 $\mu\text{g/mL}$ (ppm)임을 알 수 있었다. 이 정도의 감도는 식품 중 고등어 알레르겐을 검출하는데 충분한지를 판단하려면 parvalbumin에 대한 안전한 NOAEL(no observed adverse effect level)이 뒷받침되어야 하지만 이에 대한 연구보고가 없는 실정이다(18).

한편, 고등어 parvalbumin 및 70°C, 10분간 열처리한 생선류에 대한 특이항체의 반응성을 서로 비교한 결과, parvalbumin에 대한 특이항체의 반응성을 100%로 하였을 때, 고등어의 반응성은 0.2%였으나, 다른 생선류의 분쇄물에 대한 반응성은 대체로 $2 \times 10^{-6}\%$ 이하로 나타났다(Table 1). 따라서, 특이항체는 고등어에 대한 반응성이 다른 생선류에 비하여 월등하게 높았으나, 다른 생선류에 대하여는 반응이 매우 미약하거나 없는 것으로 나타났다.

고등어 parvalbumin의 열안정성

Parvalbumin은 열에 매우 안정하기 때문에 가열조리하여 섭취한 경우라도 알레르기 환자에게는 알레르기 반응이 유도될 수 있다(22). 그러므로 열처리 정도에 따른 고등어에 대한 특이항체의 반응성을 조사하였다. 그 결과 80°C, 10분간 열처리시 상온처리에 비하여 23배, 100°C 열처리시 2.3배 높은 반응성이 나타났으나 121°C 열처리하면 그 반응성이 1/30로 감소하였다(Fig. 4, Table 2). 따라서, 본 연구에서 개발한 sELISA분석으로 열처리한 고등어를 분석하면, 60-100°C 열처리 후에도 특이항체와의 양호한 반응을 나타내지만 이보다 높은 온도의 열처리에서는 반응성이 급격하게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 최근 Gajewski와

Table 1. Cross-reactivity of anti-parvalbumin antibody towards heated seafoods when determined by sELISA in Fig. 3

Seafood (Protein)	$C_{A450=1/2max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Cross-reactivity (%) ¹⁾
Parvalbumin	0.2	100
Mackerel	100	0.2
Others ²⁾	$<10^{72}$)	$<2 \times 10^{-6}$

¹⁾Cross-reactivity (%) = $(C_{A450=1/2max}$ of parvalbumin / $C_{A450=1/2max}$ of seafood) $\times 100$

²⁾Others: mackerel pike, salmon, flatfish, armorclad rockfish, cod fish, squid, shrimp, blue crab, and lobster

³⁾Extrapolated in Fig. 3.

Table 2. Reactivity of anti-parvalbumin antibody towards heated mackerel as determined by sELISA in Fig. 5

Temperature (°C)	$C_{A450=1/2max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Reactivity (%) ²⁾
25	30	100
60	23	120
80	1.2	2,300
100	11	230
121	850	3.3

¹⁾Mackerel muscle was homogenized, heat-treated at each temperature for 10 min, extracted, serially diluted with PBST (finally 1/100-1/100,000), and applied to the ELISA.

²⁾Reactivity (%) = $(C_{A450=1/2max}$ at 25°C / $C_{A450=1/2max}$ at the given temp.) $\times 100$

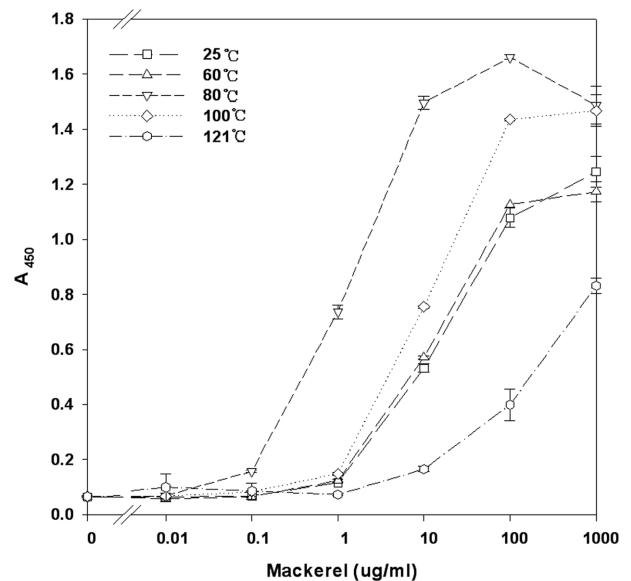


Fig. 4. Heat stability of mackerel as determined by sELISA. Mackerel muscle was homogenized, heat-treated at each temperature for 10 min, extracted, serially diluted with PBST (finally 1/100-1/100,000), and applied to the ELISA.

Hsieh(19)이 보고한 연구와도 일치하는 결과인데, 그들은 상업적으로 판매되는 parvalbumin에 대한 단클론항체인 MA b 3E1을 이용하여 여러 종류의 생선 및 갑각류 등을 100°C로 열처리하여 반응성을 확인하였으며 이에 따라 가공한 식품과 가공하지 않은 식품 모두에서 고등어 알레르겐을 검출할 수 있음을 제시하였다.

신뢰성 검증(Spike test)

신뢰성 검증을 위하여 가공식품에 농도별로 첨가한 고등어의

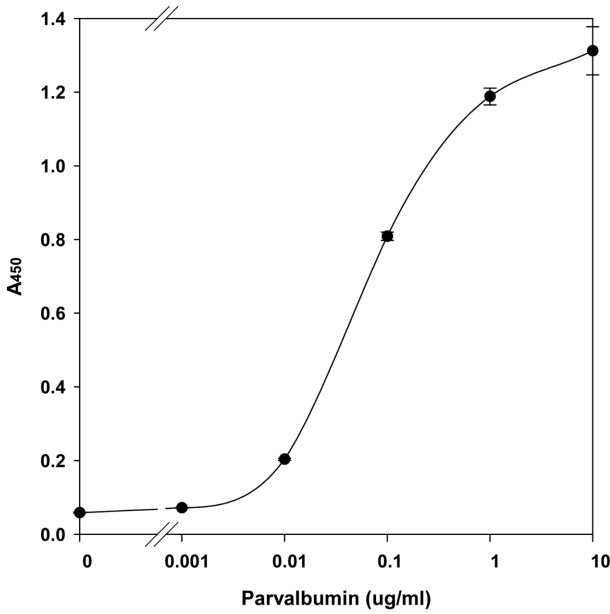


Fig. 5. Standard curve of mackerel parvalbumin by sELISA.

함량을 sELISA로 검출하고 그 분석수치의 회수율을 조사하였다. 대표적인 표준곡선을 Fig. 5에, 분석의 회수율을 Table 3에 각각 나타내었다. 이때, 가공식품은 고등어 알레르겐이 함유될 가능성이 높은 식품군인 크림스프, 이유식, 소시지, 소스를 대상으로 하였다. 그 결과 분석상의 회수율은 각각 104, 101, 54, 0%로 나타났다. 즉, 크림스프와 이유식은 매우 양호하였으나, 소시지의 경우 1/2 정도로 낮았으며, 소스의 경우에는 고등어의 분석은 거의 불가능하였다. 이와 유사한 연구의 예는 대구 parvalbumin에 대한 항체를 이용한 ELISA에서 알 수 있는데, 빵, 수프, 와인, 간장 등에 첨가한 대구 parvalbumin의 분석회수율을 조사하였을 때 간장과 와인의 경우는 그 회수율이 각각 80%와 40%로 낮게 나타났다(16). 이와 같이 시료에 따라서 분석회수율이 낮게 나타나는 까닭은 검출대상 단백질(parvalbumin)을 둘러싸고 있는 주위 환경, 즉 서로 다른 식품의 특성(지방이나 염의 함량, pH 등)에서 유래하는 소위 매트릭스 효과(matrix effect)가 항원항체 반응에 영향을 주었기 때문이다(16). 특히, 소스의 경우 sELISA 분석이 거의 불가능하였던 것은 소스에 함유된 높은 염 농도나 낮은 pH 등이 항원항체 반응을 극심하게 방해하였기 때문으로 추측한다.

가공식품 중 고등어의 검출

시판 시료 16점의 고등어 검출을 실시한 결과, 고등어가 함유된 것으로 표시된 7점 시료 중 정성적으로 검출된 것은 3점, 불검출된 것은 4점이었으며, 고등어의 함유가 표시되지 않은 시료 9점 중 검출된 것은 0점, 불검출된 것은 9점이었다(Table 4). 따라서, 표시와 검출이 정성적으로 일치하는 시료는 모두 12점으로써 75%의 일치율을 나타내었다. 하지만, 정량적으로 일치하지 않았다. 그 까닭은, 실제 시중에 고등어 함유 가공식품이 많지 않고 그나마 소스류에 편중되어 있는데, 특히 소스 중의 고등어 검출이 어려운 것은 앞선 spike test에서 밝힌 바와 같이 matrix effect와 식품가공시 높은 열변성으로 인하여 항원-항체 반응이 현격히 감소하였기 때문으로 추측된다(23). 이와 함께 여러 단계의 가공공정을 거치면서 항원결정기의 변형이 유발되고, 그와 함께 단백질들의 용해성은 극적으로 낮아짐으로써 검출이 어렵게 되는 것으로 생각된다(28).

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 고등어 parvalbumin에 대한 특이항체를 이용한 sELISA는, 소스와 같은 일부 식품에는 적용이 불가능한 문제가 있지만, 일반적인 가공식품 중 고등어의 함유유무를 정성적으로 분석하는데 효과적으로 활용 가능한 것으로 판단되었다.

요 약

기준에 생선 검출을 위한 ELISA 개발은 여러 편 보고된 바 있으나, 고등어만을 특이적으로 검출하는 방법에 관한 보고는 거의 없었다. 본 연구에서는 고등어 parvalbumin에 대한 토끼 항체를 이용하여 가공식품 중 고등어의 검출을 위한 ELISA를 개발하였다. 암모늄침전법과 Sephadex G-50 column chromatography를 이용하여 열에 안정한 12 kDa의 고등어 parvalbumin을 분리, 정제하였다. 여기에서 얻어진 parvalbumin을 토끼에게 면역하여 생산한 항 parvalbumin 항체 및 특이항체-HRP 복합물을 이용하여 샌드위치 ELISA(sELISA)의 조건을 확립하였다. 이때 parvalbumin의 검출한계는 3 ng/mL이고, 고등어(생살)의 검출범위는 5-5,000 µg/mL이었다. 이어서, 광어, 우럭, 오징어, 꽃게, 풍치, 대구, 새우, 연어, 바다가재, 고등어에 대한 교차반응을 조사한 결과 고등어에 대한 반응성은 월등히 높았으나 다른 수산식품에서는 반응성이 거의 없거나 매우 낮게 나타나 고등어에 대한 특이성이 매우 높은 항체임을 알 수 있었다. 또한 분석시 시료의 열 안정성은 100°C까지 양호하였으며 크림스프, 이유식, 소시지, 소스에 대한

Table 3. Assay recovery of parvalbumin when mackerel was spiked into foods¹⁾ as determined by sELISA

Added (ppm)		Detected							
		Cream soup		Weaning food		Sausage		Sauce	
Mackerel	Parvalbumin ²⁾	Parvalbumin (ppm)	Recovery (%)	Parvalbumin (ppm)	Recovery (%)	Parvalbumin (ppm)	Recovery (%)	Parvalbumin (ppm)	Recovery (%)
0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
100	0.2	0.19	93	0.19	97	0.13	65	N.D. ³⁾	0
300	0.6	0.57	95	0.59	99	0.25	40	N.D.	0
1,000	2	2.52	126	2.35	118	1.25	63	N.D.	0
3,000	6	5.98	100	5.43	90	2.90	48	N.D.	0
Mean±SD		-	104±15	-	101±12	-	54±12	-	0

¹⁾Foods spiked with mackerel was homogenized, heated and diluted with PBST for the quantitation of mackerel parvalbumin by sELISA.

²⁾Mackerel:parvalbumin=500:1

³⁾Not determinable

Table 4. Results of sample test for mackerel detection

Type of food	Article code	Common food name	Label of mackerel	ELISA value (A ₄₅₀)	Detected(ppm)			Remark ²⁾
					(1) Parvalbumin by ELISA	(2) Mackerel by ELISA	(3) Mackerel in sample	
Processed food	1	canned mackerel	mackerel 70%	0.731±0.013	0.22	110	2,750	O
	2	canned mackerel pike	none	0.043±0.001	N.D. ¹⁾	-	-	O
	3	dried skipjack tuna slice	none	0.048±0.002	N.D.	-	-	O
Noodle sauce	4	liquid skipjack tuna sauce	(mackerel) ³⁾	0.055±0.002	N.D.	-	-	X
	5	liquid sauce	(mackerel)	0.076±0.004	0.0035	1.75	44	O
	6	liquid sauce	(mackerel)	0.041±0.002	N.D.	-	-	X
	7	liquid sauce	mackerel ethanol extract	0.099±0.005	0.0065	3.25	81	O
	8	powdered sauce	mackerel powder	0.047±0.001	N.D.	-	-	X
	9	liquid sauce	(mackerel)	0.044±0.002	N.D.	-	-	X
Common sauce	10	oyster sauce	none	0.041±0.001	N.D.	-	-	O
	11	mixed sauce	none	0.049±0.002	N.D.	-	-	O
Cream soup	12		none	0.043±0.004	N.D.	-	-	O
	13		none	0.055±0.013	N.D.	-	-	O
Weaning food (WF)	14	vegetable WF	none	0.046±0.004	N.D.	-	-	O
	15	seafood WF	none	0.040±0.005	N.D.	-	-	O
	16	fruit WF	none	0.046±0.002	N.D.	-	-	O

(2)=(1)×500: because parvalbumin : mackerel=1:500

(3)=(2)×25: because sample was diluted to 1/25 for the assay

¹⁾N.D.=not detectable, less than 2 times of the BKG value (A₄₅₀=0.040)

²⁾“O” means qualitative coincidence of ELISA result with indication on the food package, whereas “X” means discordance. The ratio of qualitative coincidence=75%

³⁾(mackerel)=Food labeling indicated that very small amount of mackerel was added to the food.

spike test(0.01-0.3%)에서 분석회수율은 각각 104, 101, 54, 0%로 나타났다. sELISA에 의하여 16점의 시판시료 중 고등어의 함유 유무를 조사한 결과, 정성적으로 표시와 일치하는 것은 75%이었다. 그러므로 본 연구에서 개발한 sELISA는 일부 한계가 있기는 하지만, 가공식품 중 고등어를 정성적으로 검출하는데는 효과적으로 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 식품의약품안전청의 연구비 지원(과제번호: 08082영기안109)으로 수행한 연구결과의 일부입니다.

문헌

- Lee HK, Song WJ, Ha TU. 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)
- 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)
- Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: S65-S71 (2001)
- Eggesbø M, Halvorsen R, Tambs K, Botten G. Prevalence of parentally perceived adverse reactions to food in young children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 10: 122-132 (1999)
- Ostblom E, Lilja G, Pershagen G, van Hage M, Wickman M. Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life. *Clin. Exp. Allergy* 38: 1325-1332 (2009)
- Eckman J, Saini SS, Hamilton RG. Diagnostic evaluation of food-related allergic diseases. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 5: 2 (2009)
- Bannon GA. What makes a food protein an allergen? *Curr. Allergy Asthm. Rep.* 4: 43-46 (2004)
- Pele M, Brohe M, Anklam E, Van Hengel AJ. Peanut and hazelnut traces in cookies and chocolates: Relationship between analytical results and declaration of food allergens on product labels. *Food Addit. Contam.* 24: 1334-1344 (2007)
- Taylor SL, Hefle SL. Food allergen labeling in the USA and Europe - Review. *Curr. Opin. Allergy Cl. Immunol.* 6: 186-190 (2006)
- Korea Food and Drug Administration. Labeling Standards for Foods etc. *KFDA Notification No. 2010-97 (Amendment on Dec. 30, 2010)* Available from: <http://www.kfda.go.kr/index.kfda?x=7&searchkey=title:contents&mid=92&searchword=식품등의표시기준&y=4&division=&pageNo=1&seq=3362&cmd=v>. Accessed April 25, 2011.
- Kirsch S, Fourdrilis S, Dobson R, Scippo ML, Maghuin-Rogister G, De Pauw E. Quantitative methods for food allergens: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 57-67 (2009)
- Schubert-Ullrich P, Rudolf J, Ansari P, Galler B, Fhrer M, Molinelli A, Baumgartner S. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: An overview. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 69-81 (2009)
- Niemann L, Taylor SL, Hefle SL. Detection of walnut residues in foods using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food Sci.* 74: T51-T57 (2009)
- Scaravelli E, Brohe M, Marchelli R, van Hengel AJ. The effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 127-137 (2009)
- Shinobu S, Rieko M, Reiko A, Hiroshi A, Tamio M, Yasuo O. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent

- assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. *J. AOAC Int.* 91: 123-129 (2008)
16. Faeste CK, Plassen C. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J. Immunol. Methods* 329: 45-55 (2008)
 17. Chen L, Hefle SL, Taylor SL, Swoboda I, Goodman RE. Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG. *J. Agr. Food Chem.* 54: 5577-5582 (2006)
 18. Patrick W, Hans S, Angelika P. Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species in food grade fish gelatins and isinglass with parv-19 anti-parvalbumin antibodies. *J. Agr. Food Chem.* 57: 11328-11334(2009)
 19. Gajewski KG, Hsieh YH. Monoclonal antibody specific to a major fish allergen: Parvalbumin. *J. Food Prot.* 72: 818-825 (2009)
 20. Valenta R, Hayek B, Seiberler S, Bugajska-Schretter A, Niederberger V, Twardosz A, Natter S, Vangelista L, Pastore A, Spitzauer S, Kraft D. Calcium-binding allergens: From plants to man. *Int. Arch. Allergy Imm.* 117: 160-166 (1998)
 21. Van Do T, Elsayed S, Florvaag E, Hordvik I, Endresen C. Allergy to fish parvalbumins: Studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J. Allergy Clin. Immun.* 116: 1314-1320 (2005)
 22. Lim DL, Noe KH, Yi FC, Chua KY, Goh DL, Shek LP, Giam YC, Van Bever HPS, Lee BW. Parvalbumin - the major tropical fish allergen. *Pediatr. Allergy Immu.* 19: 399-407 (2008)
 23. 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)
 24. Kuehn A, Scheuermann T, Hilger C, Hentges F. Important variations in parvalbumin content in common fish species: A factor possibly contributing to variable allergenicity. *Int. Arch. Allergy Imm.* 153: 359-366 (2010)
 25. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
 26. Kim HJ, Shon DH. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of cooked goat meat. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 538-543 (2000)
 27. 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)
 28. Taylor SL, Nordlee JA, Niemann LM, Lambrecht DM. Allergen immunoassays-considerations for use of naturally incurred standards. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 83-92 (2009)