

연구노트

가공식품 중 돈육 검출을 위한 샌드위치 ELISA 개발

백수연 · 도정룡 · 손동화*
한국식품연구원 기능평가연구단

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

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

Functionality Evaluation Research Group, Korea Food Research Institute

Abstract A sandwich ELISA (sELISA) to detect pork in processed foods was developed using goat anti-pig IgG antibodies. From the sELISA standard curve, the detection range of pork was 3-1,000 µg/mL. The cross-reactivity between the pig IgG antibodies, pork, and other meats (beef, chicken, fish, and crustaceas) was 100, 0.18, and 0%, respectively. When pork was heated for 10 min, the mean assay recoveries of pig-IgG were 79-32% at 60-70°C and less than 0.11% at 80°C or higher. When pork was spiked into cream soup, weaning food, fish paste, and sauce, the mean assay recoveries were 8.8, 45, 36, and 39%, respectively. In 12 commercial processed foods, the assay results coincided qualitatively with the food labels on the packages.

Keywords: pig immunoglobulin G, enzyme-linked immunosorbent assay, processed food

서 론

식품알레르기는 특정식품에 과민한 사람이 그 음식을 섭취함으로써 생체에 들어온 특정의 단백질(알레르겐)이 면역학적 기전을 통해 부종, 천식 두드러기, 아토피피부염 등의 부작용이 일어나는 것을 말한다(1).

우리나라에서는 식품 알레르기와 관련하여 난류(가금류에 한해), 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토, 아황산염 등 총 13종을 함유하거나 이들로부터 추출한 성분을 가공식품 원료로 사용했을 때는 함유된 양과 관계없이 원재료명을 의무적으로 표시하고 있다(2). 특히 가공식품에서는 다양한 원재료가 사용되므로 알레르기 환자나 보호자에게는 알레르기 유발물질의 첨가여부를 확인하고 알레르겐이 없는 식품을 선택하여 섭취하는 것이 매우 중요하다(3).

최근 국내에서는 가공식품 중 알레르겐 분석법으로 고등어(4), 메밀(5), 새우(6) 등에 관한 분석법이 개발되었다. 기존에 상업적으로 돼지고기를 검출할 수 있는 검출법이 없었기에 돈육에 대한 특이항체 생산을 위하여 troponin I (24 kDa)을 분리하여 토끼에 면역하여 다클론항체를 만들어 ELISA를 실시하였으나 분석에 활용가능한 양질의 특이항체를 얻지 못하였다(자료미제시). 그래서 본 연구에서는 비가열 돈육 분석을 위하여 돼지 IgG 면역

글로불린을 검출 대상으로 하였을 때, 매우 우수한 결과를 얻었음을 보고한 Martin 등(7)의 문헌을 참고하여 돈육 분석법을 개발하고자 하였다. 즉, 가공식품 중 돼지고기의 함유여부를 확인하기 위하여 돼지IgG를 대상으로 한 샌드위치 ELISA 조건을 확립하고, 돈육 첨가량을 달리한 식품을 제조하여 돈육의 분석회수율을 확인하고, 시판 가공식품 중의 돈육을 검출하였다.

재료 및 방법

재료

특이항체인 항돼지IgG 항체(goat anti-swine IgG (H+L) antibody), phosphate buffered saline (PBS), 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. 돼지고기와 가공식품류 시료는 성남시 분당소재 할인매장에서 구입하였다.

특이항체-효소 복합물(anti-pig IgG antibody-HRP conjugate)의 제조

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. 활성화된 HRP를 회수한 후 0.2 M sodium carbonate buffer (pH 9.5)를 첨가하여 pH 9.0으로 조절한 용액과 0.01 M sodium carbonate buffer (pH 9.0)에 대하여 투석한 특이항체(8 mg/mL) 1 mL을 혼합한 후 상온에서 2시간 반응시킨다. 반응 후 0.1 M sodium tetrahydroborate 100 µL를 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 회수하고 PBS로 투석하여 사용하였다.

*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 January 26, 2015; revised March 23, 2015;
accepted March 23, 2015

샌드위치 ELISA (sELISA)

항돼지IgG 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. 즉, coating 과정이 끝난 각 well을 200 µL의 washing buffer (PBST)로 3회 세척한 다음, 시료용액을 각 well 당 100 µL씩 첨가하고 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% H₂O₂)을 넣고 상온에서 30분 동안 발색시킨 후, 2 M H₂SO₄를 50 µL씩 각 well에 넣어 반응을 중지시켜 microplate reader로 흡광도(A₄₅₀)를 측정하였다.

시료의 처리

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

특이항체의 교차반응

특이항체가 면역원(돼지IgG) 이외의 식품에 대해 반응하는 정도를 조사하였다. 즉, 고등어, 우럭, 홍다리 새우, 바다가재, 돈육, 계육, 우육, 오리고기 등을 시료처리 방법에 따라 준비하여 sELISA를 실시하였다. 본 연구에서 특이항체의 교차반응율은 다음 식에 의하여 구하였다. 식에서 C_{A450=0.95}는 sELISA의 수치(A₄₅₀)가 최고발색치의 50% (0.95)를 나타낼 때의 시료농도를 뜻한다.

$$\text{Cross-reactivity (\%)} = (C_{A450=0.95} \text{ of pig IgG} / C_{A450=0.95} \text{ of food}) \times 100$$

돈육 단백질의 열안정성 조사

돈육을 25, 60, 70, 80, 90, 100, 121°C에서 각각 10분간 열처리하고 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상층액에 대하여 sELISA를 실시하였다. 이때 돈육의 열안정성은 처리온도별 반응율을 기준으로 판단하였으며, 다음 식에 의하여 구하였다. C_{A450=0.8}은 sELISA의 수치(A₄₅₀)가 최고발색치의 50% (0.8)를 나타낼 때의 시료농도를 뜻한다.

$$\text{Reactivity (\%)} = (C_{A450=0.8} \text{ at } 25^\circ\text{C} / C_{A450=0.8} \text{ at the given temperature}) \times 100$$

검출법의 신뢰성 검증 및 시판시료의 분석

sELISA 검출법의 신뢰성을 검증하기 위하여 spike test를 실시하였다. 즉, 가공식품(크림수프, 이류식, 어묵, 소스)에 돈육을 첨가하고, 그 속에 함유된 돈육의 함량을 sELISA로 분석하였다. 최종 3,000-30,000 ppm의 돈육 첨가 시료를 70°C에서 10분간 열처리한 다음, PBST를 10배 첨가하고 균질화하여 추출하고, 이를 다시 PBST로 10배 희석하여 sELISA를 실시하였다. 따라서, sELISA 분석치에 희석계수 10×10=100를 곱하여 시료 중의 농도를 구하였다. 위와 동일한 방법으로 소스류 3종, 복합조미료류 4종, 경단류 3종, 만두류 2종의 시판 시료 12점에 대한 돈육 함량을 분석하였다.

결과 및 고찰

항돼지IgG 항체를 이용하여 확립한 sELISA에서 돈육 이외의 다른 원료식품에 대한 반응성을 확인하였다(Fig. 1). 먼저 돼지 IgG의 검출범위는 10-1,000 ppb (ng/mL), 검출한계는 3 ppb(0.3 ng/mL) 정도

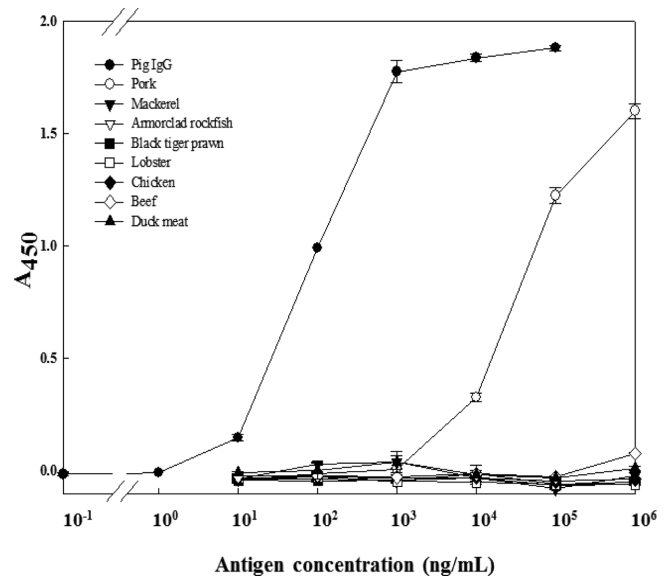


Fig. 1. Reactivity of anti-pig IgG antibody towards raw foods when determined by sELISA. Foods in PBS were heated at 70°C for 10 min, homogenized, extracted, diluted with PBST (finally 1/100-1/100k), and applied to sELISA.

Table 1. Reactivity of anti-pig IgG antibody towards heat-treated pork as determined by sELISA

Temp. (°C) ¹⁾	C _{A450=0.8} (ng/mL)	Reactivity (%) ²⁾
25	11,000	100
60	14,000	79
70	34,000	32
80	1×10 ⁸	0.11
90	1×10 ⁹	0.01
100	3×10 ¹⁰	0.003
121	∞	0

¹⁾Pork was homogenized, heat-treated at each temp. for 10 min.

²⁾Reactivity (%) = (C_{A450=0.8} at 25°C / C_{A450=0.8} at heat-treated temp.) × 100.

우 민감한 검출이 가능함을 알 수 있었다. 돈육의 검출범위는 3-1,000 ppm (µg/mL), 검출한계는 2 ppm이었다. 돼지IgG에 대한 C_{A450=0.95} 값은 87 ng/mL이고 그 반응성을 100%로 하여 원료식품에 대한 반응성을 보았다. 돈육에 대한 C_{A450=0.95} 값은 47,800 ng/mL으로 돼지IgG에 대한 반응성은 0.18% 나타났으나, 여타의 식품원료에 대하여 반응하지 않았다. 본 연구에서 확립한 sELISA는 돈육 검출을 위한 특이성이 우수하였다.

열처리한 돈육에 대한 특이항체의 반응성을 sELISA로 조사하였다(Table 1). 그 결과 상온처리(25°C)에 대한 반응성을 100%로 하였을 때 열처리 60°C의 반응성은 79%, 열처리 70°C의 반응성은 32%로 비교적 반응성이 양호하였으나, 80°C 이상으로 열처리하면 상온처리에 비하여 1/1,000배 이상 낮아졌으며, 121°C에서는 반응성을 측정하기 어려웠다. 따라서, 본 연구에서 확립한 sELISA는 돈육의 단백질이 80°C 이상으로 열처리하면 반응성이 낮게 나타남을 알 수 있었다. 열안정성이 떨어지는 단백질을 분석할 때 가능한 방법으로는 그 해당 단백질을 변성(denaturation)시킨 후, 완충액(buffer)에 투석하면서 복원(renaturation)하여 ELISA로 분석할 수도 있다고 하였다(8).

신뢰성 검증을 위하여 가공식품에 돈육을 첨가하고, 그 중에 함유된 돈육의 함량을 sELISA로 검출하고 그 분석회수율을 조

Table 2. Assay recovery of pork spiked into foods as determined by sELISA

Added pork (ppm)	Detected							
	Cream soup ¹⁾		Weaning food		Fish paste		Sauce	
	Pork (ppm)	Recovery (%)	Pork (ppm)	Recovery (%)	Pork (ppm)	Recovery (%)	Pork (ppm)	Recovery (%)
0	0	-	0	-	0	-	0	-
3,000	323	10.8	1,938	64.5	685	22.0	1,815	59.0
10,000	975	9.8	4,639	46.4	4,218	42.0	4,932	49.0
30,000	1,765	5.9	74,915	25.0	12,769	43.0	2,616	9.0
Average	-	8.8±2.6	-	45.0±20.0	-	36.0±12.0	-	39.0±26.0

¹⁾Foods spiked with pork were homogenized, heated and diluted with PBST for the quantitation of pork by sELISA.

Table 3. Detection of pork in commercial foods as determined by sELISA

Type of food	Article code	Common food name	Label of pork	ELISA value (A ₄₅₀)	Detected (ppm)		Remark ²⁾
					(A) Pork by ELISA	(B) ¹⁾ Pork in sample	
Sauce	1	liquid sauce	none	0.046±0.005	N.D. ³⁾	-	○
	2	liquid sauce	none	0.051±0.002	N.D.	-	○
	3	liquid sauce	none	0.084±0.014	N.D.	-	○
Paste	4	fish paste	none	0.080±0.010	N.D.	-	○
	5	meatball	pork 38.76%	0.265±0.037	41.8	4,180	○
	6	fish paste	none	0.044±0.001	N.D.	-	○
Dumpling	7	shrimp bun	pork	0.823±0.014	190	19,000	○
	8	Meat bun	pork	0.829±0.019	220	22,000	○
Artificial seasoning	9	powdered	none	0.055±0.003	N.D.	-	○
	10	powdered	none	0.053±0.002	N.D.	-	○
	11	powdered	none	0.058±0.008	N.D.	-	○
	12	powdered	none	0.062±0.010	N.D.	-	○

¹⁾(B)=(A)×100: because sample was diluted to 1/100 for the assay.

²⁾“O” means qualitative coincidence of ELISA result with indication on the food package, Whereas ‘X’ means discordance. The ratio of qualitative coincidence=100%.

³⁾N.D.=not detectable, less than 2 times of the BKG value (A₄₅₀=0.058)

사하였다. 돈육에 대한 표준곡선(Fig. 1)에 대한 분석회수율(Table 2)을 구하였다. 이때, 가공식품군은 크림스프, 이유식, 어묵, 소스를 대상으로 하였다. 그 결과 분석회수율은 비교적 안정된 수치를 보였으며 그 평균치는 각각 8.8, 45, 36, 39%로 나타났다.

시중에 유통되는 가공식품 시료 12점의 돈육 검출을 실시하였다. 그 결과 돈육이 함유된 것으로 표시된 3점 시료 중 검출 3점, 불검출 0점이었으며, 돈육의 함유가 표시되지 않은 시료 9점 중 검출 0점, 불검출 9점이었(Table 3). 따라서, 모든 시료에서 그 표시와 검출이 정성적으로는 일치하였다(100%). 하지만 정량적으로는 분석치가 표시보다 낮게 나타났는데, 이는 열처리로 인하여 가공식품 중 돼지IgG의 변성 때문에 특이항체의 인식이 저하되었기 때문이다.

돈육에 대한 특이항체 생산을 위하여 돈육 단백질인 troponin I (24 kDa)을 분리하고 토끼에 면역하여 다클론항체를 만들어 ELISA를 실시하였으나 돈육 troponin I 특이항체는 분석에 활용 가능한 양질의 특이항체를 얻지 못하였다. 그에 비하면 본 연구에서 개발한 돼지IgG에 대한 특이항체를 이용한 sELISA는 일반적인 가공식품 중 돈육 검출에 있어 정량적 분석치는 낮았으나, 돈육의 함유유무를 정성적으로 분석하는데 효과적 이었다. 그리고 가공식품 중 돈육 검출을 위한 sELISA는 돼지고기에 알레르기 기가 있거나 돼지고기를 종교적으로 섭취하지 않는 사람들에게 가공식품을 선택함에 많은 도움이 될 것이다.

요 약

가공식품 중 돈육의 검출을 위한 샌드위치 ELISA (sELISA)의 조건을 확립하기 위해 항돼지IgG 항체(goat anti-pig IgG antibody)를 이용하였다. 이때, 돈육의 검출범위는 3-1,000 ppm (µg/mL)이며, 검출한계는 2 ppm이었다. 특이항체의 교차반응 결과, 돼지IgG에 대한 반응성을 100%로 하였을 때, 돈육에 대한 반응성은 0.18%로 나타났으나, 여타의 식품원료에 대하여 반응하지 않았다. 열처리한 돈육에 대한 항체의 반응성은 70°C까지는 32% 이상으로 양호하였으나 80°C 이상에서는 0.11% 이하로 반응성 급격히 감소하였다. 크림스프, 이유식, 어묵, 소스에 대한 spike test에서 돈육의 분석회수율은 각각 8.8, 45, 36, 39%로 나타났다. sELISA에 의하여 12점의 시판 가공식품 시료 중 돈육의 함유 유무를 조사한 결과, 정성적으로 원료의 표시사항과 100% 일치하였다.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원의 주요사업의 하나로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Lee KH. An analysis on prevalence and allergen of food aller-

- gies. *J. Agric. Med. Community Health* 39: 14-24 (2014)
2. MFDS. Labeling standards for Foods etc. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongju, Korea. No. 2011-67 (2011)
3. 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. *J. Fd. Hyg. Safety* 28: 124-129 (2013)
4. Shon DH, Kim MH. Development of sandwich ELISA for the detection of mackerel in processed foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 1-7 (2012)
5. Back SY, Do JR, Shon DH. Development of competitive indirect ELISA for the detection of buckwheat in processed foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 269-275 (2014)
6. Do JR, Back SY, Shon DH. Development of sandwich ELISA for the detection of shrimp in processed foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 538-543 (2014)
7. Martin R, Azcona JI, Casas C, Hernandez PE, Sanz B. Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. *J. Food Protect.* 51: 790-794 (1988)
8. Shon DH, Kim HJ, Eum BW, Kim SH, Kim SM. An enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of soy proteins in food. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 991-996 (2000)