

< Original Article >

돼지고기 제품 내 닭고기 검출을 위한 TaqMan[®] real-time PCR의 적용

고바라다* · 김지연 · 나호명 · 박성도 · 김용환

광주광역시보건환경연구원

Application of the TaqMan[®] real-time PCR assay for the detection of chicken (*Gallus gallus*) meat in pork products

Ba-Ra-Da Koh*, Ji-Yeon Kim, Ho-Myung Na, Seong-Do Park, Yong-Hwan Kim

Health & Environment Research Institute of Gwangju, Gwangju 500-210, Korea

(Received 5 August 2013; revised 29 August 2013; accepted 3 September 2013)

Abstract

Many consumers are increasingly concerned about the meat they eat, and accurate labelling is important due to public health, economic and legal concerns. Meat species adulteration is a common problem in the retail markets. In this study, a TaqMan[®] quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) assay was applied for its ability to quantify chicken meat, which was not indicated on the label, in 79 commercial pork products (ham, sausages, bacon and ground meat) produced by 10 different manufacturers. The amplification efficiency was 82.05% and the square regression coefficient (R^2) was 0.995. PCR results showed that 38.6% of ham samples, 50.0% of sausages samples, and 50.0% of ground meat samples were contaminated with chicken residuals, while the bacon samples were not contaminated with chicken residuals. Only twelve pork products of one of the manufacturers were in accordance with indicated in their labels. The PCR assay reported in this work could be particularly useful in inspection programs to verify the food labelling of commercial processed meats and to gain consumers' trust.

Key words : Real-time PCR, Quantitative detection, Pork products, Chicken, Adulteration

서 론

식육가공품에 표시된 원료육을 확인하는 것은 저가육류의 혼입이나 허위표시 검출, 소비자의 건강을 보호하기 위해서 그리고 경제적 및 종교적 이유 때문에 중요하다(Ballin, 2010; Meyer 등, 1995). 햄과 소시지와 같은 식육가공품은 어린이 기호식품으로써 특정 동물 단백질에 알레르기가 있는 소비자에게는 제품의 표시사항이 매우 중요하다.

현재 식육가공품에 함유된 다양한 식육을 동정하

기 위해서 단백질과 DNA 분석이 주로 사용된다. 동물의 단백질 항원을 검사할 수 있는 상업용 검사키트는 ELISA-TEK[™] (ELISA Technologies, USA)이 판매되고 있다. 그러나 식품 처리 과정 중에 수용성 단백질의 변성 때문에 열처리된 식품 검사에는 제약이 따른다. 이런 제약을 극복하기 위해서 모든 생명체의 모든 조직에 있는 매우 안정적인 생물학적 분자인 DNA에 기반을 둔 분석방법이 널리 사용된다(Fajardo 등, 2010).

Polymerase chain reaction (PCR)은 식품에 어떤 동물성 성분이 포함되어 있는지를 검출하기 위해서 간단하고 빠르며 매우 민감한 분석방법으로 가장 널리

*Corresponding author: Ba-Ra-Da Koh, Tel. +82-62-613-7673, Fax. +82-62-613-7649, E-mail. barada@korea.kr

Table 1. Egg-related ingredients on the label of pork products declared only pork contents in real-time PCR assays

Egg-related ingredients	Type of pork product				Total
	Ham	Sausage	Bacon	Ground meat	
Egg white powder	25	3			28
Egg white solution	4	1			5
Produced on shared equipment with eggs	2	1	1		4
No labelling	26	13	1	2	42
Total	57	18	2	2	79

사용된다(Ballin 등, 2009; Fajardo 등, 2010; Koh 등, 2011). 그러나 PCR은 반응 후 증폭산물을 전기영동을 통해 확인하는 단계를 거쳐야 하는 단점이 있다. 따라서 최근에는 종 특이성이 매우 높은 real-time PCR이 각광받고 있다(Cammà 등, 2012; Dooley 등, 2004; Jonker 등, 2008; Koh 등, 2012; López-Andreo 등, 2005; Tanabe 등, 2007). 이 기술은 형광 마커를 사용하여 자동으로 PCR 산물을 실시간으로 확인하고, 많은 시료를 동시에 처리할 수 있다(Koh 등, 2012).

Koh 등(2012)은 원료육과 열처리 식육에 사용된 동물 종을 감별하기 위해서 TaqMan[®] probe에 기반을 둔 real-time PCR로 핵 내 유전자와 미토콘드리아 유전자를 표적으로 하여 소, 돼지 그리고 닭을 다른 동물 종과 교차반응 없이 감별하였다.

이번 조사는 식품에 대한 올바른 정보를 소비자에게 제공하기 위해서 Koh 등(2012)이 보고한 real-time PCR을 이용하여 국내에서 유통되는 햄과 소시지 등 식육가공품 중 돼지고기만을 사용한 제품에 닭고기 함유 여부와 정량검사를 하였다.

재료 및 방법

공시재료

식육가공품의 표시사항에 돼지고기만을 사용한 제품을 대상으로 닭고기 함유여부를 조사하기 위해 2010년 3월부터 9월 사이에 시중에서 유통되는 햄 57건, 소시지 18건, 분쇄가공육 2건 그리고 베이컨 2건으로 총 79건을 구매하였으며, 난백 성분의 사용 여부를 조사하였다(Table 1).

난백분 또는 난백액이 사용된 제품은 32건, 달걀이 함유된 제품과 동일 제조시설에서 생산된 제품은 4

Table 2. PCR reaction mix components

Reaction component	Concentration	Volume (μL)	
		FGF7 for pig	ND3 for chicken
Takara master mix	2×	10.0	10.0
ROX II	50×	0.4	0.4
Forward primer	10 pmol/μL	0.8	0.8
Reverse primer	10 pmol/μL	0.6	0.8
TaqMan [®] probe	10 pmol/μL	1.0	1.0
IPC12S-2514F	10 pmol/μL	0.35	0.35
IPC12S-2363R	10 pmol/μL	0.35	0.35
IPC18S-2434P	10 pmol/μL	0.35	0.35
DNA sample	10 ng/μL	1.0	1.0
Water		5.15	4.95
Total		20.0	20.0

건, 난백 성분 사용 표시가 없는 제품은 42건으로 조사되었다.

그리고 달걀의 난황과 난백에 대한 유전자 검출 여부를 조사하기 위해서 삶은 달걀 3건을 실험에 사용하였다.

Genomic DNA 추출

식육가공품 등 시료에서 genomic DNA 추출은 Koh 등(2011)의 방법에 따라 실시하였다. 추출된 DNA는 NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)를 이용하여 260 : 280 nm에서 정량하여 실험에 사용하였다. 돈육제품 79건의 DNA 농도는 10 ng/μL이 되도록 희석하였다.

TaqMan[®] real-time PCR 반응 조건

돼지고기와 닭고기 DNA 검출을 위한 TaqMan[®] real-time PCR은 Koh 등(2012)의 방법에 따라 실험을

Table 3. Results of the analysis of pork products containing egg-related ingredients using chicken-specific primers in real-time PCR

Egg-related ingredients	Type of pork product (%)				Total
	Ham	Sausage	Bacon	Ground meat	
Labelling	16/31* (51.6)	5/5 (100)	0/1 (0.0)		21/37 (56.7)
No labelling	6/26 (23.1)	4/13 (30.8)	0/1 (0.0)	1/2 (50.0)	11/42 (26.2)
Total	22/57 (38.6)	9/18 (50.0)	0/2 (0.0)	1/2 (50.0)	32/79 (40.5)

*Number of detected chicken genes/Number of tested samples.

Table 4. Results of egg white and egg yolk using chicken-specific primers in real-time PCR

Sample	DNA concentration (ng/μL)	Chicken C _T value	IPC [†] C _T value
Egg white 1	3.6	-*	32.7
Egg white 2	7.3	-	33.6
Egg white 3	9.6	-	31.7
Egg yolk (n=3)	50	29.7±2.0	27.9±1.9
Egg yolk (n=3)	10	32.0±2.0	30.3±1.7

*None detected. [†]Internal positive control.

하였다. PCR 반응액은 Premix Ex Taq (2×, Perfect Real time, Takara, Japan)과 ROX (50×, Takara, Japan)를 이용하여 Table 2와 같이 실험하였다.

유전자 증폭기는 7500 FAST Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 95°C에서 1분간 1회 pre-denaturation 실시한 후, 95°C에서 15초, 55°C에서 1분 주기를 40회 반복하였다. 증폭결과는 7500 software (Ver. 2.0.5, Applied Biosystems, USA) 프로그램을 이용해 확인하였다.

표준곡선 작성

정량검사에 사용된 돼지고기의 표준시료는 닭고기가 검출되지 않는 햄 제품을 사용하였으며, 닭고기의 표준시료는 닭 가슴살로 제조된 통조림 제품을 사용하였다.

표준곡선은 닭고기 DNA 100%를 포함하여 돼지고기 DNA에 닭고기 DNA 농도가 10%, 5%, 1%, 0.1% 그리고 0.01% 되도록 DNA 혼합물을 준비하였고, 이들 시료의 최종 DNA 농도는 10 ng/μL이다.

Real-time PCR에서 획득된 C_T 값에 상응하는 닭고기 DNA 함량에 대한 표준곡선은 7500 software (Ver. 2.0.5, Applied Biosystems, USA)를 이용하였다.

Table 5. Results of the chicken DNA detection for pork products of ten food companies

Company	Type of pork product (%)			Total
	Ham	Sausage	Ground meat	
A	2/10* (20.0)	2/6 (33.3)	1/2 (50.0)	5/19 (26.3) [†]
B	0/8 (0.0)	0/4 (0.0)		0/12 (0.0)
C	2/7 (28.6)	2/2 (100)		4/9 (44.4)
D	3/9 (33.3)			3/9 (33.3)
E	3/8 (37.5)			3/9 (33.3) [†]
F	2/5 (40.0)	3/3 (100)		5/8 (62.5)
G	5/5 (100)	1/2 (50.0)		6/7 (85.7)
H	2/2 (100)	1/1 (100)		3/3 (100)
I	2/2 (100)			2/2 (100)
J	1/1 (100)			1/1 (100)
Total	22/57 (38.6)	9/18 (50.0)	1/2 (50.0)	32/79 (40.5) [†]

*Number of detected chicken genes/Number of tested samples. [†]One bacon product was included in the total. [‡]Two bacon products were included in the total.

통계분석

돈육제품의 난백 성분 표시사항과 닭고기 DNA 검출 시료 수 등에 대한 상관성 조사는 SPSS 12.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 Pearson 카이제곱 검정을 활용하였다.

결 과

제품 종류별 닭고기 DNA 검출 결과

돈육제품 79건 중 닭고기 DNA 검출은 햄 22건 (38.6%), 소시지 9건(50.0%), 분쇄가공육 1건(50.0%)으로 모두 32건(40.5%)이었으며, 베이컨 2개 제품은 표시사항과 모두 일치하였다(Table 3).

표시사항에 난백 성분이 사용된 제품에 대한 닭고

기 DNA 검출은 햄 16건(51.6%), 소시지 5건(100%)으로 모두 21건(56.7%)이었다. 난백 성분 미표시 제품에 대한 닭고기 DNA 검출은 햄 6건(23.1%), 소시지 4건(30.8%), 분쇄가공육 1건(50.0%)으로 모두 11건(26.2%)이었다. 난백을 사용한 제품이 미표시 제품보다 닭고기 검출률이 높았다($P=0.006$).

한편 삶은 달걀의 난황에서 닭고기의 *ND3* 유전자가 검출되었지만, 난백에서는 검출되지 않았다. 내재성 유전자(Internal positive control, IPC)는 난황과 난백 모두에서 확인되었다(Table 4).

제조사별 닭고기 DNA 검출 결과

이번 조사에 사용된 돈육제품은 모두 10개 제조사의 제품이었다(Table 5). B 제조사의 12개(햄 8개, 소시지 4개) 제품에서는 난백 관련 성분 표시와 상관없이 닭고기 DNA가 검출되지 않아 표시사항과 모두 일치하였다. 제조사별 닭고기 DNA 검출은 A사 5건(26.3%), C사 4건(44.4%), D와 E사는 각각 3건(33.3%), F사 5건(62.5%) 그리고 G사 6건(85.7%)이었다. H, I 및 J 제조사의 모든 제품(6건)에서는 닭고기 DNA가 검출되었다.

표준곡선

닭고기 DNA 함량 측정을 위한 표준곡선을 Fig. 1에 나타내었다. 시료의 C_T 값과 표준곡선으로부터 얻은 결정계수(Coefficient of determination, R^2)는 0.995로 매우 높아 표준곡선의 linearity가 매우 높고, 정량

에 적합하였으며, 증폭효율은 82.05%이었다.

제품 종류별 닭고기 DNA 정량 결과

닭고기 DNA가 검출된 돈육제품 32건에 대한 정량 검사를 한 결과는 Table 6과 같았다. 돈육 DNA 검출을 위한 FGF real-time PCR의 C_T 값(평균±표준편차)은 22건의 햄 제품에서 $29.58±1.46$, 9건의 소시지 제품에서 $28.41±0.63$ 이었으며, 닭고기 DNA 검출을 위한 *ND3*-real time PCR의 C_T 값은 22건의 햄 제품에서 $27.26±3.69$, 9건의 소시지 제품에서 $29.41±2.81$ 이었다.

닭고기 DNA 검출 함량을 1% 미만, $1≤<10%$ 그리고 10% 이상으로 구분하여 분석한 결과는 Table 7과 같았다. 햄 57건 중 닭고기 DNA의 검출 건수는 모두 22건(38.6%)으로 real-time PCR을 이용한 정량 분석 결과는 다음과 같았다. 닭고기 함량이 1% 미만으로 확인된 제품 중 난백 성분 표시 제품 8건(14.0%), 미표시 제품 3건(5.3%)으로 모두 11건(19.3%)이었다. 닭고기 함량이 $1≤<10%$ 에 해당하는 제품 중 7건(12.3%)의 난백 성분 표시 제품에서만 확인되었다. 닭고기 함량이 10% 이상인 제품 중 난백 성분 표시 제품 1건(1.8%), 미표시 제품 3건(5.3%)으로 모두 4건(7.0%)이었다.

소시지 18건 중 닭고기 DNA의 검출 건수는 모두 9건(50.0%)으로 real-time PCR을 이용한 정량 분석 결과는 다음과 같았다. 닭고기 함량이 1% 미만 제품 중 난백 성분 표시 제품 4건(22.2%), 미표시 제품 3건(16.7%)으로 모두 7건(38.9%)이었다. 닭고기 함량이 $1≤<10%$ 에 해당하는 제품 중 난백 성분 표시 제품

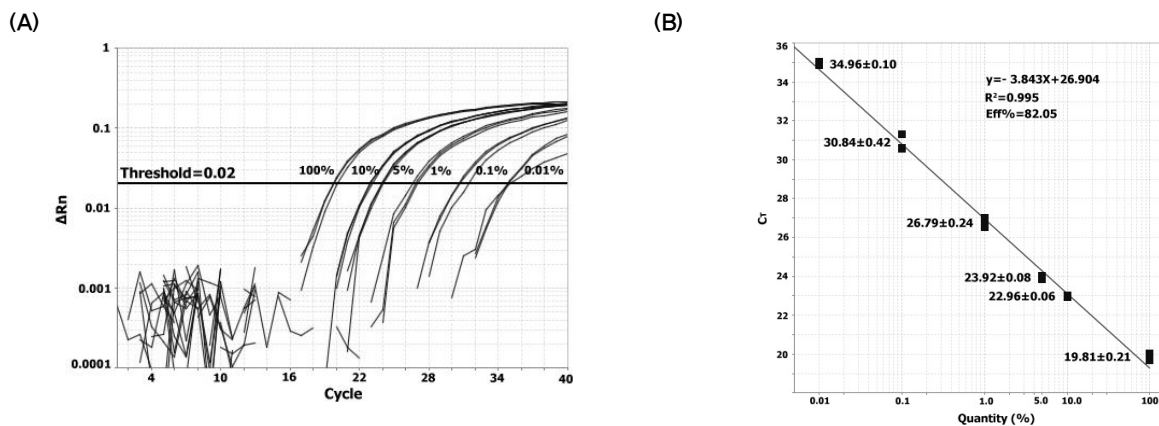


Fig. 1. Real-time PCR graph obtained with chicken DNA using chicken-specific *ND3* primers and probe. (A) Quantitation graphs of real-time PCR detection for chicken DNA. All reactions were run in triplicate. (B) Standard curve for chicken PCR products obtained from pork DNA of spiked chicken DNA in the range between 0.01% (0.001 ng/μL) and 100% (10 ng/μL).

Table 6. Results of the analysis of pork products declared only pig content from real-time PCR for pig and chicken, respectively

Type of product	Declared pork content (%)	Egg-related ingredient	Pig real-time PCR		Chicken real-time PCR		Estimated chicken content (%)
			FGF7	IPC	ND3	IPC	
Ham 8	90.65	EWP*	28.83	19.45	29.69	20.64	0.20
Ham 10	86.53	EWP	28.54	19.08	32.20	20.75	0.04
Ham 15	83.38	EWP	28.29	18.77	31.46	19.96	0.07
Ham 16	80.39	EWP	33.01	21.02	22.75	21.81	12.70
Ham 18	78.72	EWP	28.65	19.35	23.95	20.21	6.21
Ham 19	83.83	EWP	28.11	18.18	24.18	19.43	5.39
Ham 33	90.53	EWP	28.96	19.47	26.08	20.50	1.73
Ham 42	80.19	EWP	28.56	19.23	24.75	20.24	3.85
Ham 78	83.71	EWP	28.83	19.68	30.94	20.85	0.09
Ham 83	90.91	EWP	28.05	18.23	28.22	19.05	0.48
Ham 84	90.01	EWP	29.25	19.09	25.10	19.45	3.11
Ham 87	81.82	EWP	29.03	19.75	28.97	19.71	0.31
Ham 90	78.43	EWP	28.71	19.34	27.32	19.96	0.82
Ham 41	75.49	EWS†	29.15	19.59	29.44	20.84	0.23
Ham 80	76.76	EWS	28.11	18.68	25.86	19.47	1.98
Ham 35	85.87	WI‡	30.29	20.53	25.12	21.47	3.07
Ham 69	86.63	-.§	29.77	19.63	30.75	20.58	0.11
Ham 71	94.50	-	31.82	22.45	30.71	23.62	0.11
Ham 82	95.48	-	30.62	21.04	35.05	21.70	0.01
Ham 88	82.34	-	30.12	19.96	22.79	20.09	12.45
Ham 89	75.60	-	32.43	21.05	21.83	20.89	22.03
Ham 91	81.26	-	31.58	20.32	22.55	20.94	14.34
Sausage 1	84.95	-	27.40	18.42	29.98	19.90	0.17
Sausage 2	86.35	EWP	27.98	19.62	30.00	21.05	0.17
Sausage 29	87.39	EWP	27.83	18.92	26.05	20.14	1.76
Sausage 30	90.21	EWP	28.84	19.56	30.55	20.58	0.12
Sausage 28	74.43	EWS	28.44	19.02	28.13	20.04	0.51
Sausage 32	85.79	WI	29.60	20.11	28.97	21.10	0.31
Sausage 65	86.22	-	28.58	18.95	35.73	20.29	0.01
Sausage 67	86.81	-	28.58	19.21	28.62	20.11	0.38
Sausage 68	87.03	-	28.43	19.44	26.70	20.33	1.19
Ground meat 50	74.06	-	30.22	20.60	26.82	21.93	1.11

*Egg white powder. †Egg white solution. ‡Produced in a facility that also processes eggs. §Not declared egg ingredients. C_T values obtained from 10 ng/μL DNA sample. Mean±SD of C_T values for FGF7 real-time PCR of ham and sausage is 29.58±1.46 and 28.41±0.63, respectively. Mean±SD of C_T values for ND3 real-time PCR of ham and sausage is 27.26±3.69 and 29.41±2.81, respectively.

Table 7. The frequency of estimated chicken DNA content (%) range by type of pork products considered egg-related ingredient

Egg-related ingredient	Ham (%) (n=57)				Sausage (%) (n=18)				Total (%) (n=79)			
	<1	1≤~<10	≥10	Total	<1	1≤~<10	≥10	Total	<1	1≤~<10	≥10	Total
Labelling	8 (14.0)	7 (12.3)	1 (1.8)	16 (28.1)	4 (22.2)	1 (5.6)	ND	5 (27.8)	12 (15.2)	8 (10.1)	1 (1.3)	21 (26.6)
No labelling	3 (5.3)	ND*	3 (5.3)	6 (10.5)	3 (16.7)	1 (5.6)	ND	4 (22.2)	6 (7.6)	2† (2.5)	3 (3.8)	11 (13.9)
Total	11 (19.3)	7 (12.3)	4 (7.0)	22 (38.6)	7 (38.9)	2 (11.1)	ND	9 (50.0)	18 (22.8)	10† (12.7)	4 (5.1)	32 (40.5)

*None detected. †One ground meat product was included in the total.

1건(5.6%), 미표시 제품 1건(5.6%)으로 모두 2건(11.1%)이었으며, 10%를 초과한 제품은 없었다.

햄과 소시지 79건 중 닭고기 함량이 1% 미만 제품

은 난백 성분 표시 제품 12건(15.2%), 미표시 제품 6건(7.6%)으로 모두 18건(22.8%)이었다. 닭고기 함량이 1≤~<10%에 해당하는 제품 중 난백 성분 표시 제품

Table 8. The frequency of estimated chicken DNA content (%) range for pork products of ten food companies

Company/ type of product	Egg-related ingredient									
	Labelling (%)					No labelling (%)				
	ND*	<1	1 ≤ <10	≥10	Total	ND	<1	1 ≤ <10	≥10	Total
A	5 (62.5)	2 (25.0)	1 (12.5)		8 (100)	9 (81.8)	1 (9.1)	1 (9.1)		11 (100)
Ham	4 (66.7)	1 (16.7)	1 (16.7)		6 (100)	4 (100)				4 (100)
Sausage		1 (100)			1 (100)	4 (80.0)	1 (20.0)			5 (100)
Bacon	1 (100)				1 (100)					1 (100)
Ground meat						1 (50.0)	1 (50.0)			2 (100)
B	4 (100)				4 (100)	8 (100)				8 (100)
Ham	4 (100)				4 (100)	4 (100)				4 (100)
Sausage						4 (100)				4 (100)
C	2 (40.0)	1 (20.0)	2 (40.0)		5 (100)	3 (75.0)	1 (25.0)			4 (100)
Ham	2 (50.0)		2 (50.0)		4 (100)	3 (100)				3 (100)
Sausage		1 (100)			1 (100)		1 (100)			1 (100)
D / Ham	2 (50.0)	2 (66.7)	2 (50.0)	1 (33.3)	3 (100)	6 (100)				6 (100)
Ham	2 (50.0)		2 (50.0)		4 (100)	4 (80.0)	1 (20.0)			5 (100)
Bacon						3 (75.0)	1 (25.0)			4 (100)
E	3 (37.5)	4 (50.0)	1 (12.5)		8 (100)	1 (100)				1 (100)
Ham	3 (60.0)	2 (40.0)			5 (100)					5 (100)
Sausage		2 (66.7)	1 (33.3)		3 (100)					3 (100)
G	2 (100)				2 (100)	1 (20.0)	2 (40.0)	2 (40.0)		5 (100)
Ham	2 (100)				2 (100)	1 (33.3)	1 (33.3)	2 (66.7)		3 (100)
Sausage						1 (50.0)	1 (50.0)			2 (100)
H	1 (100)				1 (100)	2 (100)				2 (100)
Ham	1 (100)				1 (100)	1 (100)				1 (100)
Sausage						1 (100)				1 (100)
I / Ham	2 (100)				2 (100)					2 (100)
J / Ham	16 (43.2)	12 (32.4)	8 (21.6)	1 (2.7)	37 (100)	31 (73.8)	6 (14.3)	2 (4.8)	1 (100)	42 (100)
Total	14 (73.7)	3 (15.8)	2 (10.5)		19 (100)	47 (59.5)	18 (22.8)	10 (12.7)	1 (100)	79 (100)

*None detected.

8건(10.1%), 미표시 제품 2건(2.5%)으로 모두 10건(12.7%)이었다. 닭고기 함량이 10% 이상인 제품 중 난백 성분 표시 제품 1건(1.3%), 미표시 제품 3건(3.8%)으로 모두 4건(5.1%)이었다.

제조사별 닭고기 DNA 정량 결과

돈육제품 79건에 대한 제조사별 닭고기 검출량을 분석한 결과는 Table 8과 같았다. 닭고기 DNA가 10% 이상 검출된 제품은 D사의 9개 햄 제품 중 난백 성분을 사용한 1건과 G사의 5개 햄 제품 중 난백 성분 표시가 없는 2건 그리고 J사의 햄 1건이었다.

A사 제품 중 난백 사용 제품인 햄과 소시지에서 닭고기 DNA 함량이 1% 미만은 각각 1건이었고, 1%~<10%에 해당하는 제품은 햄 1건이었다. 난백 미사용 제품 중 1% 미만은 소시지 1건이었고, 1%~<10%에 해당하는 제품은 분쇄가공육 1건이었다. 따라서 A사 19개 제품 중 1% 미만은 3건(15.3%), 1%~<10%는 2건(10.5%)이었으며, 표시사항과 동일한 제품은 14건으로 일치율은 73.7%이었다. 돈육 제품의 표시사항 일치율은 C사 55.6%, D와 E사 66.7%, F사 37.5%, G사 14.3%이었으며, 표시사항과 모두 일치한 제조사는 B사, 모두 일치하지 않은 제조사는 H, I 및 J사이었다.

고 찰

Real-time PCR을 이용한 정량분석은 미지의 시료 내에서 표적 유전자의 C_T 값과 표준시료에서 같은 표적 유전자에 대한 C_T 값을 표준곡선과 비교하여 분석하며, 빠른 결과, 많은 처리량, 높은 민감도 등의 특징을 가지고 있다(Bottero와 Dalmaso, 2011; Dooley 등, 2004; Laube 등, 2007b; Tanabe 등, 2007). 대부분의 정량 기술은 표적 유전자로써 열변성에 의해 야기된 DNA 단편을 적절한 크기의 PCR 산물로 증폭할 수 있으며, 다양한 축종에 대한 수 많은 표준염기서열 정보로 축종감별이 가능하므로 미토콘드리아 DNA가 널리 사용되었다(Bottero와 Dalmaso, 2011; Montiel-Sosa 등, 2000). Laube 등(2003)은 PCR 저해제와 DNA 붕괴에 의한 위음성 결과를 예측하기 위해서 종 특이적이며 myostatin에 특이적인 PCR과 probe로 구성된 dual system을 사용하였다. 이들과 달리 이번 연구도 닭고기 DNA 검출을 위해 dual system으로 미

토콘드리아 유전자인 NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3)와 IPC로써 18S rRNA를 이용한 Koh 등(2012)이 제시한 real-time PCR을 사용하였다.

이번 연구는 식육가공품의 표시사항에 돼지고기만을 사용한 제품 79건을 대상으로 닭고기 함유여부, 정량검사 및 표시사항에 기재된 난백 성분과의 연관성을 조사한 결과 32건(40.5%)에서 닭고기 DNA가 검출되었으며, 난백을 사용한 제품이 미표시 제품보다 닭고기 검출률이 높았다($P=0.006$). Ghovvati 등(2009)은 multiplex PCR로 소시지 40.0%, cold cut 30.0%에서 표시사항에 없는 닭고기를 검출하였다. 한편, Di Pinto 등(2005)은 말고기로 생산된 소시지 30건에 대해 duplex PCR 방법으로 1건에서는 말고기를 사용하지 않으며, 6건(20.0%)에서 돼지고기가 검출되었다고 보고하였다. Rojas 등(2011)이 타조고기로 생산된 소시지 23건에 대해서 real-time PCR로 표시사항에 기록되지 않은 돼지고기 13건(56.5%)을 검출하였다. 이런 결과는 저렴하면서 쉽게 혼합할 수 있는 육류를 첨가하고 표시사항을 허위로 기재했을 가능성과 같은 제조시설에서 생산하면서 부적절한 장비 세척에 의해서 비의도적인 오염의 가능성이 있다고 제기하였다.

이번 연구 결과에서 난백 성분 미표시 제품 42건에서 닭고기 DNA 검출률이 1% 미만인 6건(7.6%)의 5개 식품 제조사는 제조시설의 부적절한 관리에 의한 비의도적인 오염으로 추정된다. 그 이유는 난백 성분 표시와 상관없이 모든 제품에서 닭고기가 검출되지 않은 B 제조사의 12개 제품이 있었기 때문이다. 그리고 닭고기 DNA 함량이 10%를 초과한 4건(5.1%)의 3개 식품 제조사에서는 돼지고기보다 값싼 닭고기를 의도적으로 혼합하였을 가능성이 있을 것으로 추정한다. 한편, 닭고기 DNA가 1% 미만으로 검출된 제품 일지라도 달걀 성분 또는 닭고기와 같은 단백질에 알레르기 반응을 보이는 환자에게는 이번 연구결과가 매우 중요한 정보로 활용될 것이며, 향후 국내에서도 엄격한 제도하에서 품질 검증이 이루어져야 한다고 생각한다. 그리고 이번 연구에서 난백 성분에 대한 닭고기 검출을 위한 ND3 유전자 검사에서 Table 4처럼 음성으로 확인되었기 때문에 제품 표시사항에 난백 성분을 사용했던 37개 제품 중 21개(56.7%)에서 닭고기 DNA가 검출된 것은 난백성분이 아닌 닭고기가 혼입된 결과로 생각한다. 물론 난백성분을 사용하지 않았던 제품 42건 중 닭고기 DNA가 검출된 11건(26.2%)은 닭고기가 혼입된 결과이다.

Koh 등(2012)은 TaqMan[®] probe을 이용한 real-time PCR에서 닭고기의 원료육과 열처리육에 대한 검출 한계는 1.0 pg/ μ L이었으며, 이번 연구에서 돈육제품에서 검출된 닭고기 DNA의 최저 함량은 0.01%로써 Table 6에서 Ham 82 제품이었다. Dooley 등(2004)은 cytochrome b (cytb)로 TaqMan assay을 이용한 DNA 50 ng 농도에서 닭에 특이적인 primer가 30 cycle 이후에 돼지에서 교차반응이 관찰되었다. 그러나 Koh 등(2012)이 제시한 TaqMan assay의 반응조건 40 cycle에서도 닭에 특이적인 primer는 돼지고기 DNA 50 ng에서 교차반응이 나타나지 않았다. 따라서 Koh 등(2012)의 방법은 Dooley 등(2004)이 제시한 방법보다 우수하였다.

Real-time PCR의 정량능력과 정확성은 DNA 추출량에 영향을 미치는 인자 즉 다른 종, 같은 종의 다른 개체, 같은 개체의 다른 조직 사이에서 세포당 미토콘드리아 유전자의 양에 차이가 있기 때문에 미토콘드리아 DNA를 정량분석에 사용하는 것에 대해 문제가 제기되었다(Fajardo 등, 2010; López-Andreo 등, 2005; Lopparelli 등, 2007). 만약에 내용 구성물과 처리과정의 동일한 조건이 적절한 표준곡선의 작성에 이용할 수 있다면, 축산물가공품에 함유된 표적 축종 내용물의 정량추정이 가능할 수 있다. 하지만 이는 실질적인 측면에서 실현 가능성은 없다(Prado 등, 2009). 이런 이유로 전체 지육에서 유래된 동물성 식품에 대해 종 특이적인 DNA의 정량 분석으로써 미토콘드리아 DNA의 사용을 결과적으로 권장할 수 없을 것이다. 이런 문제를 극복하기 위해서는 핵에 존재하는 single copy genomic DNA를 이용한 real-time PCR 검사로 중량 대 중량보다 유전체와 유전체의 비율로 표현하는 것이 신뢰성 있는 것이라고 권장하였다(Ballin 등, 2009; Bottero와 Dalmaso, 2011).

그러나 근육과 비교하여 다른 부위의 조직(간, 심장, 근육, 뇌 등)에서 추출될 수 있는 DNA 양은 현저히 차이가 난다(Buntjer 등, 1999; Laube 등, 2007a). 이런 이유로 식육제품에 심장 또는 간 등의 조직이 포함되어 있다면 식육의 혼합비율을 측정에서 과도한 발현량을 나타내기 때문에 핵 내에 존재하는 single-copy DNA를 이용할지라도 식육의 혼합비율을 확인할 수 없다고 보고하였다(Laube 등, 2007a). 이번 정량검사에 사용된 표준시료는 실제 시중에서 유통되는 햄과 소시지처럼 동일한 조건으로 시료를 제조하는데 어려움이 있어 시중에서 유통되는 제품을 사용하였고, 미토콘드리아 유전자를 이용한 닭고기

DNA 검출량은 참고수준으로 활용하는 것이 바람직할 것으로 생각한다.

하지만 이번 연구를 통해 시중에 유통되는 돈육 제품 중에서 표시사항에 기재되지 않은 닭고기의 검출과 정량분석에 real-time PCR 방법이 매우 유용함을 확인할 수 있었다. 따라서 소비자에게 안전하고 신뢰성 있는 식품을 공급하기 위해서 식품제조업체는 제품생산에서 원료육, 시설, 품질 및 표시사항 관리를 엄격히 시행하여 더욱더 나은 제품을 생산할 수 있도록 좀 더 세심한 주의를 기울여야 할 것이다.

결 론

TaqMan[®] real-time PCR을 이용하여 국내에서 유통되는 식육가공품 중 돼지고기만을 사용한 10개 제조사의 79개 제품에 대해 닭고기 DNA 검출 여부를 조사한 결과 햄 22건(38.6%), 소시지 9건(50.0%), 분쇄가공육 1건(50.0%)으로 모두 32건(40.5%)에서 닭고기 DNA가 검출되었다. 베이컨 2건에서는 닭고기 DNA가 검출되지 않았다. 10개 제조사 중 단 한 개 제조사의 제품만이 표시사항과 일치하였다. 닭고기 DNA 정량을 위한 표준곡선의 결정계수는 0.995이었다. 닭고기 함량이 1% 미만 제품은 18건(22.8%), 1%~<10%에 해당하는 제품은 10건(12.7%) 그리고 10%를 초과한 제품은 4건(5.1%)이었다. 난백 성분 표시 제품이 표시가 없는 제품보다 닭고기 검출률이 높았다($P=0.006$). 식육감별을 위한 실시간 유전자 검사법은 식품산업의 신뢰성을 확보하고 올바른 정보를 소비자에게 제공하기 위한 유용한 검사법으로 확인되었다.

감사의 글

이번 연구는 광주광역시보건환경연구원의 2010년도 연구사업 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Ballin NZ. 2010. Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 86: 577-587.
- Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. 2009. Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science* 83: 165-174.

- Bottero MT, Dalmaso A. 2011. Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet J* 190: 34-38.
- Buntjer JB, Lamine A, Haagsma N, Lenstra JA. 1999. Species identification by oligonucleotide hybridisation: the influence of processing of meat products. *J Sci Food Agric* 79: 53-57.
- Cammà C, Domenico MD, Monaco F. 2012. Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control* 23: 400-404.
- Di Pinto A, Forte VT, Conversano MC, Tantillo GM. 2005. Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control* 16: 391-394.
- Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, Brown HM. 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science* 68: 431-438.
- Fajardo V, González I, Rojas M, García T, Martín R. 2010. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology* 21: 408-421.
- Jonker KM, Tilburg JJ, Hägelea GH, de Boer E. 2008. Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25: 527-533.
- Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, Moussavi AH, Javadmanesh A. 2009. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 20: 696-699.
- Koh BRD, Kim JY, Na HM, Park SD, Kim YH. 2011. Development of species-specific multiplex PCR assays of mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA for the identification of animal species. *Korean J Vet Serv* 34: 297-301.
- Koh BRD, Kim JY, Na HM, Park SD, Kim YH. 2012. Development of TaqMan[®] probe-based real-time PCR for rapid identification of beef, pork and poultry meat. *Korean J Vet Serv* 35: 215-222.
- Laube I, Spiegelberg A, Butschke A, Zagon J, Schauzu M, Kroh L, Broll H. 2003. Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. *Food Sci Technol Int* 38: 111-118.
- Laube I, Zagon J, Broll H. 2007a. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *Food Sci Technol Int* 42: 336-341.
- Laube I, Zagon J, Spiegelberg A, Butschke A, Kroh LW, Broll H. 2007b. Development and design of a 'ready-to-use' reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in foods. *Food Sci Technol Int* 42: 9-17.
- López-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto MI, Puyet A. 2005. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 339: 73-82.
- Lopparelli RM, Cardazzo B, Balzan S, Giaccone V, Novelli E. 2007. Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. *J Agric Food Chem* 55: 3429-3434.
- Meyer R, Höfelein C, Lüthy J, Candrian U. 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J AOAC Int* 78: 1542-1551.
- Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncalés P, López-Pérez MJ, Pérez-Martos A. 2000. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J Agric Food Chem* 48: 2829-2832.
- Prado M, Fumière O, Boix A, Marien A, Berben G, von Holst C. 2009. Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed. *Anal Bioanal Chem* 394: 1423-1431.
- Rojas M, González I, Pavón MÁ, Pegels N, Hernández PE, García T, Martín R. 2011. Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control* 22: 523-531.
- Tanabe S, Hase M, Yano T, Sato M, Fujimura T, Akiyama H. 2007. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 3131-3135.