

Real-time PCR을 이용한 식육원료의 의도적, 비의도적 혼입 판별법 개발

김규현* · 김미라 · 박영은 · 김용상 · 이호연 · 박용춘¹ · 김상엽² · 최장덕 · 장영미

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 신중유해물질팀,

¹식품의약품안전처 신소재식품과, ²부산지방식품의약품안전청 유해물질분석팀

Detection and Differentiation of Intentional and Unintentional Mixture in Raw Meats Using Real-time PCR

Kyu-Heon Kim*, Mi-Ra Kim, Young-Eun Park, Yong-Sang Kim, Ho-Yeon Lee,
Yong-Chjun Park¹, Sang Yub Kim², Jang Duck Choi, and Young-Mi Jang

New Hazardous Substance Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety

¹Novel Food Division, Ministry of Food and Drug Safety

²Hazardous Substances Analysis, Busan Regional Korea Food and Drug Administration

(Received July 4, 2014/Revised August 17, 2014/Accepted October 8, 2014)

ABSTRACT - In this study, the detection method was developed using real-time PCR to distinguish 4 species (bovine, porcine, horse, and chicken) of raw meats. The genes for distinction of species about meats targeted at *12S rRNA* and *16S rRNA* parts in mitochondrial DNA. Probes were designed to have a 5' FAM and a TAMRA at the 3' end. This study is to develop 4 species-specific primer and probes about raw materials and real-time PCR on 10 strains to observe the products of non-specific signal for similar species. As a result, any non-specific signal were not detected among each other. Real-time PCR method was developed for quantitation and identification of intentional and unintentional mixture in ground mixed meat (The difference of C_T value between intentional mixture and 100% meat: ≤ 4 cycles, The difference of C_T value between unintentional mixture and 100% meat: ≥ 6 cycles). The detection and differentiation of intentional and unintentional mixture in this study would be applied to food safety management for eradication of adulterated food distribution and protection of consumer's right.

Key words: Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction), Raw Meats, mt (mitochondrial) DNA

소고기, 돼지고기 및 닭고기 등은 국내 식생활에 중요한 부분을 차지하는 축산물로, 경제 성장 및 식생활의 서구화로 소비가 폭발적으로 증가하였다¹⁾. 식육가공품에 표시된 원료육을 확인하는 것은 저가육류의 혼입이나 허위 표기 검사 및 소비자의 건강을 보호하기 위하여 매우 중요하다^{2,3)}. 특히 중국 및 동남아시아 등으로부터 불량식품으로 의심되는 식품의 수입이 증가하고 있고, 그 제조 수법이 다양해지면서 국민의 건강이 위협받고 있어 이에 대한 관리방안 마련이 절실하다. 국내뿐만 아니라 세계적으로 이슈가 되었던 말고기 혼입 햄버거 패티의 경우도 식

육을 원료로 한 대표적인 불량식품이라고 할 수 있다. 또한 중국 공안부에서는 불량 육포 및 가짜 양고기 사례를 포함한 각 지역 공안 당국이 적발한 '10대 불량 육류식품 범죄사례'⁴⁾를 발표한 바 있어 식육가공품을 포함한 전반적인 식품에 대한 국민의 불안감이 커지고 있는 상황이다.

식육가공품 중 원료육의 부정확한 표시나 제조 과정 중 원료육 외의 원료들의 의도적 혼합과 비의도적 혼입을 관리하기 위해서는 제품에 함유된 원료육을 모니터링 할 수 있는 특이적이고 효율적인 분석 방법의 개발이 필요하다⁵⁾. 현재 식육가공품에 함유된 원료육을 확인하기 위한 방법으로는 단백질과 유전자 분석이 있다. 하지만, 단백질은 동물이 도축되고 나서 생물학적 활성이 감소되고, 조직에 따라 특성이 달라지며, 열과 압력 처리 과정을 거치는 동안 변성되기 때문에 가공된 시료에서 원료육을 감별하기는 매우 어렵다⁶⁾. 이러한 이유로 최근에는 유전자를 대상으로 하는 분석법을 주로 사용하고 있다^{7,8)}. 유전자는 모

*Correspondence to: Kyu-Heon Kim, New Hazardous Substance Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, 187 Osongsaengmyeong2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea.
Tel : 82-43-719-4453, Fax : 82-43-719-4450
E-mail : khkim95@korea.kr

든 동물의 조직 내에 존재하며 식품 제조 공정 중 처리되는 압력, 고열 등에 대하여 단백질 보다 안정성이 높은 장점이 있고, 유전물질을 분석하는 것이므로 계절이나 지역적으로 원료육에서 단백질 함량의 차이로 인한 분석 결과의 오차를 줄일 수 있다⁹⁾.

PCR (Polymerase Chain Reaction)은 식품에 어떤 원료육이 포함되어 있는지 확인하기 위한 방법으로 매우 간단하고 빠른 분석 방법으로 가장 보편적으로 사용되고 있다^{10,11,12)}. 최근에는 기존의 PCR 방법 보다 신속하고 높은 감도로 증폭이 되며, 오염률을 줄일 수 있는 장점을 가진 real-time PCR을 활용하고 있다. Real-time PCR은 기존 PCR의 단점인 허위 양성(false positive)을 배제시켜 결과의 신뢰성이 높으며, PCR 산물들의 제한효소에 의한 절단 및 아가로즈 겔에서의 확인 등의 과정을 생략할 수 있어 짧은 시간 내에 다량의 시료 분석이 가능하다. 현재 국내에서도 GMO 원료의 정량분석^{13,14)}, 한우육 감별¹⁵⁾ 등 real-time PCR을 이용한 식품의 정량분석법 적용 범위가 증가하고 있다.

Real-time PCR은 TaqMan[®]과 같은 probe를 사용하는 방법^{16,17,18,19)}과 SYBR[®] Green과 같은 DNA interrelating dyes를 사용하는 방법^{20,21,22)}이 있다. DNA 이중나선과 결합하는 SYBR[®] Green 형광물질을 사용하는 real-time PCR 방법의 경우 저렴하며, 각각의 probe 설계 없이 사용할 수 있다는 장점이 있지만, 표적 DNA 이외에 비 특이적인 PCR 산물과 결합할 가능성이 있기 때문에 real-time PCR 반응조건 설정에 유의하여야 한다²³⁾. 이에 반해 TaqMan[®]과 같은 probe를 사용하는 방법은 probe 설계 및 고가의 시약이 사용되는 단점이 있지만, 표적 염기서열에 특이적으로 반응하는 장점이 있다²⁴⁾.

따라서 본 연구에서는 소고기, 돼지고기, 닭고기 및 말고기를 포함한 식육원료 혼입 여부를 판별하기 위한 real-time PCR법을 개발하였으며, 원료육을 제외한 혼합육의 의도적 혼합 및 비의도적 혼입 여부를 판별하는데 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 전처리

시료로 사용한 소고기, 돼지고기 및 닭고기는 청주 대형마트에서 가공되지 않은 생육을 덩어리 형태로 구입하여 사용하였다. 또한 말고기의 경우 제주도에 위치한 말고기 전문점에서 나머지 식육과 같은 형태로 구입하였다. 특이도 확인을 위해 사용한 비교종 시료(염소고기, 사슴고기, 양고기, 칠면조고기 및 타조고기)는 서울근교 농장에서 가공되지 않은 생육 형태로 구입하여 사용하였다. 본 연구에서는 시료를 동결건조 시킨 후 분쇄하여 원료를 혼합하는 방법과 각각의 유전자를 추출하여 혼합하는 두 가

지 방법을 사용하였다. 동결건조 된 식육의 혼합은 기준 식육 10 g을 100%로 하였다. 소고기에 말고기 혼합 시 50% 함량은 소고기 5 g에 말고기 5 g을 혼합하고, 30%의 경우에는 소고기 3 g에 말고기 7 g을 혼합하였으며, 10%의 경우에는 소고기 1 g에 말고기 9 g을 혼합하였다. 동일한 방법으로 소고기에 돼지고기, 돼지고기에 닭고기를 혼합한 시료에서 유전자를 추출하였다. 유전자 혼합 방법은 식육에서 유전자를 추출한 뒤 10 ng/ μ l의 농도가 되도록 희석하여 준비하고, 각 함량에 맞게 혼합하였다. 소고기에 말고기 혼합 시 50% 함량은 소고기 유전자 50 μ l에 말고기 유전자 50 μ l를 혼합하고, 30%의 경우에는 소고기 유전자 30 μ l에 말고기 유전자 70 μ l를 혼합하는 방법으로 총 부피가 100 μ l가 되도록 혼합하였다. 동일한 방법으로 소고기에 돼지고기, 돼지고기에 닭고기를 혼합하여 시료를 준비하였다.

유전자 추출 및 확인

시료에서 genomic DNA 추출은 DNeasy Blood & Tissue kit를 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)를 이용하여 260:280 nm에서 순도를 확인 후 10 ng/ μ l 농도로 정량하여 실험에 사용하였다.

종 특이 프라이머 및 프로브 설계

미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록되어 있는 소(Accession No. KF163094), 돼지(Accession No. DQ207755), 말(Accession No. EF597512) 및 닭(Accession No. HQ857210)의 mitochondrial DNA 서열 정보를 이용하여 12S와 16S ribosomal RNA gene 부위에 대한 염기서열을 대상으로 종 특이 프라이머 및 프로브를 설계하였으며, 비교·분석에는 BioEdit (ver. 7.0.9.0, USA)를 사용하였다. 종 특이 프로브의 5' 말단에 표지된 형광물질은 6-carboxylfluoresin (FAM)이며, 3' 말단에는 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)를 표지하였다. 소, 돼지, 말 및 닭의 종 특이 프라이머 및 프로브는 Table 1에 나타내었다.

Real-time PCR 반응액 및 반응 조건

Real-time PCR을 위한 종 특이 프라이머는 정방향 및 역방향 프라이머 각각 10 pM, 프로브는 2 pM로 희석하여 1 μ l씩 첨가하였으며, PowerAmp[™] Real-time PCR MasterMix (KogeneBiotech, Korea)는 10 μ l, 주형 DNA는 5 μ l를 첨가하여 총 반응액이 20 μ l가 되도록 멸균증류수를 첨가하였다. 유전자 증폭기는 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 50°C에서 2분간 1회, 95°C에서 10분간 1회 실시한 후, 95°C에서 15초, 61°C에서 40초 주기를 40회 반복하였다. 증폭 결과는 7500 software

Table 1. Information of species-specific primer and probe using in this study

Item	Name	Primer Sequence(5' → 3')	Amplicons size (bp)	Ref.
Bovine	SFI13-rt-bovine-F	TCT CAA CTG ACA ACA CAA AAC CC	112	this study
	SFI13-rt-bovine-R	AGG AGA GGA TTT GAA TCT CTC GA		
	SFI13-rt-bovine	CCC TAG AAC AGG GCT TAG TTA AGG TGG CA		
Porcine	SFI11-Pig-F	CAA CCT TGA CTA GAG AGT AAA ACC	136	34)
	SFI11-Pig-R	GGT ATT GGG CTA GGA GTT TGT TAT TAG T		
	SFI13-rt-porcine	TTG GGA ATA TGT TGG TGA ATT TGT T		this study
Horse	SFI11-Hor-F	TAC AAC CTT CAT TAG AGA GTA AGA ACA AG	142	34)
	SFI11-Hor-R	CAG TAT GAG ATT AGG AGT TAG TTT GGG		
	SFI13-rt-horse	TGT CGT TGA GCT TGA AC		this study
Chicken	SFI13-rt-chicken-F	CAA ACC TTT CTT CCC AAG CA	159	this study
	SFI13-rt-chicken-R	TTT ACC AAC CCT GGG TTG C		
	SFI13-rt-chicken	AGG CAC ACT CAG CAG TAG CCC AAG ACG		

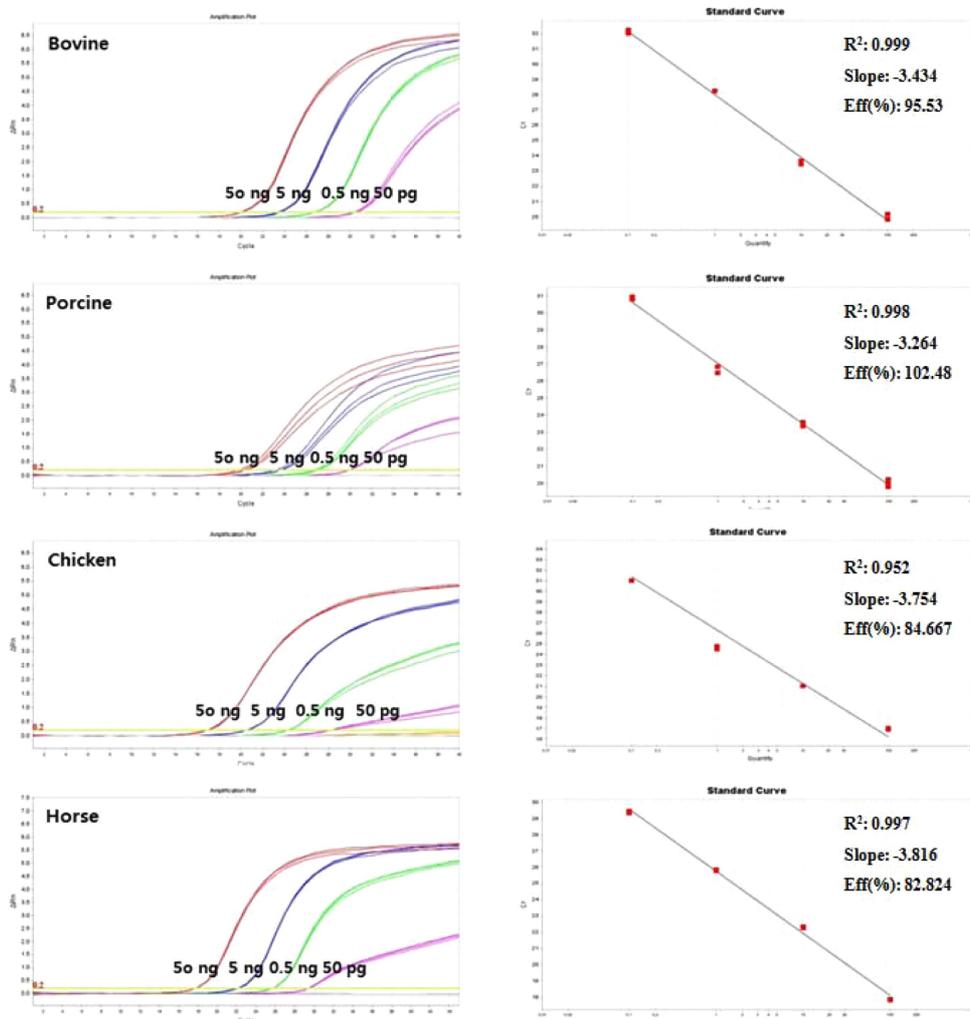


Fig. 1. Quantitative graphs of real-time PCR detection for bovine, porcine, chicken and horse DNA. All reactions were run in triplicate.

(Ver. 2.0.5, Applied BioSystems, USA) 프로그램을 통해 확인하였다.

통계 분석

원료 혼합 방법과 추출 유전자 혼합 방법의 상관성을 조사하기 위해 100%, 50%, 30% 및 10% 함량에 따른 3

반복 실험을 진행하여 F-TEST와 T-TEST를 통해 시료 간 유의적 차이의 유무를 확인하였다.

결 과

Real-time PCR을 통한 특이도 확인

대상종으로 소고기, 돼지고기, 닭고기 및 말고기 4종을 사용하였으며, 비 특이적 반응 여부를 확인하기 위하여 비교종으로 염소고기, 사슴고기, 양고기, 칠면조고기 및 타조고기 5종을 대상으로 하였다. 대상종 4종에 대한 real-time PCR에서 대상종은 각각의 종 특이 프라이머 및 프로브 셋트에서만 증폭곡선을 나타내었으며, 비교종에 대해서는 증폭곡선이 나타나지 않아 대상종과 비교종 사이의 교차 반응은 없는 것으로 확인하였다(data not showed).

Real-time PCR을 통한 프라이머 프로브 세트의 민감도 확인

대상종에 대한 특이 프라이머와 프로브 세트를 이용한 민감도 확인을 위해 대상종의 DNA를 50 ng/μl로 정량한 후 10배씩 희석하여 검출한계를 확인하였다. 결과의 신뢰도를 높이기 위하여 3반복 실험하였으며, 그 결과 대상종 모두 검출 한계는 50 pg/μl까지 확인하였다(Fig. 1).

함량별 및 원료 혼합법에 따른 결과 확인

확립된 조건을 토대로 real-time PCR 방법을 이용하여 원료 혼합법에 따른 결과를 비교하였다. 소고기에 말고기와 돼지고기를 혼합한 각각의 시료와 돼지고기에 닭고기를 혼합한 시료를 100%, 50%, 30% 및 10% 함량별로 준비하여 실험을 진행하였고, 실험의 정확성을 위해 3반복 실험을 진행하였으며, F-TEST와 T-TEST를 통해 시료 간 유의적 차이의 유무를 확인하였다. 확인 결과, 동결건조 후 원료를 혼합하는 방법과 각각의 원료로부터 추출한 유전자를 함량에 따라 혼합하는 방법은 각각 유의적 차이가 없는 것으로 확인되었다(Table 2).

식육의 의도적 혼합, 비의도적 혼입 판별 가능성 확인

원료 또는 추출 유전자를 대상으로 혼합한 혼합법에 따른 real-time PCR의 결과가 유의적인 차이가 없다는 결과를 토대로 유전자 혼합방법을 이용하여 식육원료의 의도적 혼합과 비의도적 혼입 판별 가능성을 확인하였다. 단, 비의도적 혼입이란 분쇄육을 제조하는 기계의 세척이 완벽하지 않거나 현장에서 분쇄기를 공동 사용함으로 인하여 발생할 수 있는 경험적 수치인 1%를 가정하여 식육의 함량을 100%, 50%, 30%, 10%, 1% 및 0.1%로 유전자 혼합하여 2반복 실험하고, 각 함량의 C_T (Threshold Cycle) 값을 100% 함량일 때의 C_T 값과 대조하여 그 차이를 확인한 결과, 100% 시료와의 C_T 값 차이가 4 Cycle 이내라면 의도적 혼합이라 생각할 수 있으며, 6 Cycle 이상이라

Table 2. The comparison of C_T value of processed meat product by real-time PCR

Content (%)	C _T value		
	Meat products mixture by freeze drying	DNA mixture	
bovine (mixed porcine)	100	20.88 ± 0.53 ^a	20.94 ± 0.04 ^a
	50	21.78 ± 0.21 ^a	21.80 ± 0.14 ^a
	30	22.59 ± 0.22 ^a	22.52 ± 0.02 ^a
	10	24.13 ± 0.06 ^a	23.98 ± 0.10 ^a
bovine (mixed horse)	100	21.11 ± 0.52 ^a	21.71 ± 0.07 ^a
	50	21.94 ± 0.42 ^a	22.46 ± 0.21 ^a
	30	22.92 ± 0.30 ^a	23.27 ± 0.02 ^a
	10	24.51 ± 0.09 ^a	24.78 ± 0.24 ^a
porcine (mixed chicken)	100	20.96 ± 0.00 ^a	20.87 ± 0.11 ^a
	50	21.48 ± 0.09 ^a	21.45 ± 0.15 ^a
	30	22.49 ± 0.03 ^a	22.43 ± 0.07 ^a
	10	23.42 ± 0.29 ^a	23.32 ± 0.38 ^a

All values represent mean ± S.D. of triplicate determinations. (n = 3)
^aMeans within the same row without a common letter are significantly different at p < 0.05 by F-TEST and T-TEST.

Table 3. Real-time PCR results for mixed meat samples

Content (%)	mixed sample	C _T value				difference of 100% sample
		1st Test	2nd Test	mean		
Porcine	100	18.22	18.22	18.22	0.00	
	50	19.42	19.34	19.38	1.16	
	30	20.20	20.14	20.17	1.95	
	10	21.62	21.70	21.66	3.44 ^a	
	1	24.83	24.83	24.83	6.61 ^b	
	0.1	27.98	28.10	28.04	9.82	
Horse	100	15.68	15.80	15.74	0.00	
	50	16.63	16.62	16.63	0.89	
	30	17.42	17.37	17.40	1.66	
	10	19.10	18.96	19.03	3.29 ^a	
	1	22.21	22.21	22.21	6.47 ^b	
	0.1	25.52	25.68	25.60	9.86	
Chicken	100	17.24	17.33	17.29	0.00	
	50	18.19	18.24	18.22	0.93	
	30	18.96	18.94	18.95	1.67	
	10	20.29	20.42	20.36	3.07 ^a	
	1	23.84	23.87	23.86	6.57 ^b	
	0.1	27.23	27.18	27.21	9.92	

^aIntentional mixture

^bUnintentional mixture

면 비의도적 혼입임을 예상할 수 있음을 확인하였고, 이를 통해 식육의 의도적 혼합 및 비의도적 혼입 판별 가능성을 확인하였다(Table 3).

고찰

본 연구에서 사용한 real-time PCR의 장점 중 하나인 분석 시간의 단축, PCR 반응 후 반응 생성물의 확인을 위한 과정 불필요, 즉 fluorogenic 표지를 사용하는 민감한 검출 방법을 사용하기 때문이다. 또한 real-time PCR을 이용한 정량분석은 미지의 시료 내에서 표적 유전자의 C_T 값과 표준시료에서 같은 표적 유전자에 대한 C_T 값을 표준곡선과 비교 분석하여, 많은 처리량 및 높은 민감도 등의 특징을 가지고 있다고 보고되었다^{17,25}.

소고기 등 대상종을 검출하기 위한 종 특이 프라이머 및 프로브는 미토콘드리아 유전자 중 *12S rRNA*와 *16S rRNA* 유전자를 대상으로 설계하였으며 real-time PCR에 적용할 수 있는 반응액 조성 및 PCR 조건을 개발하였다. 또한 개발된 프라이머 및 프로브를 이용하여 식육원료의 의도적 혼합 및 비의도적 혼입을 판별할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이번 연구에서 사용한 미토콘드리아 유전자는 핵 DNA 보다 세포 당 copy 수가 많아 동물 종 판별에 매우 효과적인 유전자라고 보고되었다²⁶. 미토콘드리아 유전자를 이용하여 소, 돼지, 닭 및 오리를 비롯한 사슴 등의 야생 동물 종을 감별하는 연구도 다수 보고되었다^{27,28}.

본 연구에서 개발한 소고기, 돼지고기, 닭고기 및 말고기를 판별하기 위한 프라이머 및 프로브의 검출한계는 50 pg/ μ l로 기존에 연구되어진 수준과 비슷하지만 뛰어난 민감도는 나타나지 않았다. 이는 Table 1에 제시한 SFI13-rt-bovine-R 프라이머의 3' 말단 부분의 염기 중 한 개를 구아닌에서 시토신으로 교체(TGGA → TCGA)하고, SFI11-Pig-F 프라이머의 3' 말단 부분의 염기 중 한 개를 티민에서 시토신으로 교체(AATC → AACG)하여 설계함으로써 비특이적인 반응을 억제하여 특이성을 높였지만 염기서열의 변화로 민감도가 감소한 것으로 추정된다²⁹.

언론 보도에 따른 불량식품 제조 사례를 살펴보면 경제적 이득을 목적으로 저가의 원료를 혼합하는 행위가 주를 이루고 있다. 특히, 소비가 증가한 식육가공품은 저가의 타 원료를 적게는 10%부터 많게는 50%까지 혼합하는 사례가 있었다. 비의도적 혼입은 분쇄육을 제조하는 기계의 세척이 완벽하지 않거나, 동일한 칼로 서로 다른 식육을 다루었을 경우 1% 미만의 비의도적 혼입이 존재할 것으로 예상되었다.

이와 같은 경우 PCR을 통한 방법으로 저가의 식육원료의 함유 여부를 확인할 수는 있지만, 제조업체의 부주의나 위생상의 문제로 인한 비의도적 혼입 여부를 판단하기에는 한계가 있다. Real-time PCR은 cycle이 진행됨에 따라 유전자가 지수적으로 증가하며, 이론적으로 유전자간 10배 차이가 날 때 Slope이 대략 -3.3 정도이므로 약 3.3 cycle의 C_T 값 차이가 생긴다³⁰. 이는 100%, 50%, 30% 등의 함유에 따른 차이를 정량하기에는 C_T 값의 차이가 매우 작

기 때문에 정확한 정량이 어렵다는 의미를 내포한다. 따라서 본 연구에서는 원료육 이외의 식육원료가 비의도적으로 혼입되었을 경우 1% 미만의 혼입이 존재하며, 의도적으로 혼합할 경우 10% 이상의 혼입이 존재할 것으로 예상하고, 100% 식육과 대조실험을 진행하여 C_T 값의 차이로 의도적 혼합과 비의도적 혼입의 판단 가능성을 확인하였다. 비의도적 혼입인지 의도적 혼입인지의 여부가 중요한 유전자변형농산물의 경우 유럽의 허용 한계치는 0.9%³¹, 일본 5%³²로 나라마다 다양하며, 우리나라에서는 비의도적 혼입 허용치를 3%로 관리하고 있다. 실제로 유전자 변형 콩이 아니었는데 유전자 변형 옥수수를 담았던 운반차에 남아있던 GMO 곡물가루가 non-GMO 콩 표면에 묻어 유전자 변형 검사에서 양성 반응이 나타나 표면을 세척한 후 재검사에서 non-GMO 판정을 받은 사례도 있었다(personal communication)¹⁴. 또한 real-time PCR의 정량 능력과 정확성은 DNA 추출량에 영향을 미치는 인자인 세포 당 미토콘드리아 유전자의 양에 차이이기 때문에 DNA 추출 과정마다 함량의 변화가 있는 미토콘드리아 DNA를 정량분석에 사용하는 것에 대한 문제는 계속해서 제기되었으며^{11,19}, 이러한 문제를 해결하기 위해서는 유전자를 추출하는 처리 과정을 동일한 조건으로 고정하여 유전자의 양을 일정하게 얻어야 하지만 실질적인 측면에서 실현 가능성이 매우 낮을 수 있다³³. 또한 가공식품에서의 real-time PCR을 통한 GMO 식품의 정량분석 시 전체적으로 사용된 GMO 원료보다 낮게 나타나는 경향을 보였다는 보고도 있었다¹³. 따라서 본 연구를 통한 의도적 혼합 및 비의도적 혼입 판별법은 참고자료로 활용하는 것이 바람직할 것으로 생각되며 체계적인 추가 연구가 진행되어야 한다고 판단하였다.

이번 연구를 통한 판별법은 식육원료를 대상으로 표시 이외의 저가의 타 원료육을 혼합하는 등의 불량식품 유통 근절에 활용도가 클 것으로 기대하며, 생산자 입장에서 비의도적 혼입을 방지하기 위해 세심한 주의를 기울여야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전평가원 2013년도 연구개발사업지원비(13161축산물924)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

요약

본 연구에서는 식육원료 4종(소, 돼지, 말 및 닭)을 각각 판별하기 위하여 real-time PCR을 이용한 판별법을 개발하였다. 종 판별을 위한 유전자로는 미토콘드리아 유전자 중 *12S rRNA*와 *16S rRNA* 부분을 대상으로 하였으며,

특이 프로브의 Reporter dye는 FAM, Quencher dye는 TAMRA로 설계하였다. 개발된 프라이머 및 프로브 세트 로 유사종에 대한 비 특이적 signal의 생성 유무를 관찰하기 위하여 총 10종을 대상으로 특이성을 확인한 결과, 비 특이적 signal은 확인되지 않았다. 식육원료에 대하여 real-time PCR을 통한 식육 판별 시 식육 혼합 방법에 따른 C_T 값의 유의적인 차이는 없었다. 의도적 혼합 및 비의도적 혼입을 판별하기 위한 정량법 개발에서는 의도적 혼합의 경우 100% 식육과의 C_T 값 차이가 4 cycle 이내이고, 비의도적 혼입일 경우 100% 식육과의 C_T 값 차이가 6 cycle 이상이었다. 따라서 본 연구를 통하여 개발한 식육 원료의 의도적, 비의도적 혼입 판별법은 불량식품 유통 근절 및 소비자 인권보호에 크게 기여할 것으로 기대된다.

참고문헌

- Han S.H.: Special Report-Meat Product, *Food Engineering Progress*, 103-125 (1990).
- Ballin, N.Z.: Authentication of meat and meat products, *Meat Science*, **86**, 577-587 (2010).
- Meyer, R., Höflein, C., Lüthy, J. and Candrian, U.: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food, *JAOAC Int.*, **78**, 1542-1551 (1995).
- 중국공안부 발표/13.5.
- Park Y.C., Kim M.R., Lim J.Y., Park Y.E., Shin J.H., Hwang C.R., Lim J.D., Kim K.H., Lee J.H., Cho T.Y., Lee H.J. and Han S.B.: A Comparison of Gene Extraction Methods for the Identification of Raw materials from Processed Meat Products, *J. Fd Hyg. Safety*, **27**, 146-151 (2012).
- Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalés, P., López-Pérez, M.J. and Pérez-Martos, A.: 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 (2000).
- Fabric, T., Celia, M. and Catherine, H.: Food and forensic molecular identification: update and challenges, *TRENDS in Biotech*, **23**, 359-366 (2005).
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol. Mar. Bio. and Biotech.*, **3**, 294-299 (1994).
- Jeon Y.J., Kang E.S. and Hong K.W.: A PCR Method for Rapid Detection of Buckwheat Ingredients in Food, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **50**, 276-280 (2007).
- Ballin, N.Z., Vogensen, F.K. and Karlsson, A.H.: Species determination-Can we detect and quantify meat adulteration?, *Meat Science*, **83**, 165-174 (2009).
- Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T. and Martín, R.: A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species, *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 408-421 (2010).
- Koh B.R.D., Kim J.Y., Na H.M., Park S.D. and Kim Y.H.: 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 (2011).
- Min D.M., Kim M.Y., Jung S.I., Heo M.S., Kim J.K. and Kim H.Y.: Quantitative Analysis of Genetically Modified Soybean in Processed Foods Using Real-time PCR, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **36**, 723-727 (2004).
- Yun S.C.: Detection of Genetically Modified Genes from Soybean Sprout Products, *Korean J. Crop Sci.*, **49**, 227-231 (2004).
- Kim J.M., Nam Y.S., Choi J.H., Lee M.A., Jeong J.Y. and Kim C.J.: Identification of *Hanwoo* (Korean Native Cattle) Beef in Restaurants using Real-time PCR, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **25**, 203-209 (2005).
- Cammá, C., Domenico, M.D. and Monaco, F.: Development and validation of fast Real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures, *Food Control*, **23**, 400-404 (2011).
- Dooley, J.J., Paine, K.E., Garrett, S.D. and Brown, H.M.: Detection of meat species using *TaqMan* real-time PCR assay, *Meat Sci.*, **68**, 431-438 (2004).
- Jonker, K.M., Tilburg, J.J., Hägelea, G.H. and de-Boer, E.: Species identification in meat products using real-time PCR, *Food Addit Contamm Part A Chem Anal Control Expo Risk Asswss*, **25**, 527-533 (2008).
- López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M.I. and Puyet, A.: Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time PCR, *Anal. Biochem.*, **339**, 73-82 (2005).
- López-Andreo, M., Garrido-Pertierra, A. and Puyet, A.: Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples, *Agric Food Chem.*, **54**, 7973-7978 (2006).
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hemández, P.E. and Martín, I.G.: SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs, *Meat Sci.*, **82**, 252-259 (2009).
- Walker, J.A., Hughes, D.A., Anders, B.A., Shewale, J., Sinha, S.K. and Batzer, M.A.: Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification, *Anal. Biochem.*, **316**, 259-269 (2003).
- Klein, D.: Quantification using real-time PCR technology: Application and limitations, *Trends Mol. Med.*, **8**, 257-260 (2002).
- Crockett, A.O. and Wittwer, C.T.: Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides, *Anal. Biochem.*, **290**, 89-97 (2001).
- Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T. and Akiyama, H.: A real-time PCR quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods, *Biosci. Biotechnol Biochem.*, **71**, 3131-3135 (2007).
- Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalés, P., López-Pérez, M.J. and Pérez-Martos, A.: 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 (2000).
27. Fajardo, V., González-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P.E., García, T. and Martín, R.: PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*), *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 1144-1150 (2006).
 28. Lanzilao, I., Burgalassi, F., Fancelli, S., Settimelli, M. and Fani, R.: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial *cyt b* gene from species of dairt interest, *J. AOAC Int.*, **88**, 128-135 (2005).
 29. Minh, B. and Zhongchi, L.: Simple allele-discriminating PCR for cost-effective and rapid genotyping and mapping, *Plant Methods*, **5**, 1-8 (2009).
 30. Ha S.J.: Rapid detection of *Clostridium difficile* by real-time PCR and whole genome amplification (WGA), *Kookmin University*, (2013).
 31. Kuiper, H.A.: Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organism, *Food Control*, **10**, 339-349 (1999).
 32. Hino, A.: Development of Detection Method for Monitoring of GM Foods, International Symposium on the Genetically Modified Foods, *KFDA*, 49-52 (2001).
 33. Prado, M., Fumière, O., Boix, A., Marien, A., Berben, G. and von-Holst, C.: Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed, *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 1423-1431 (2009).
 34. Park Y.C., Ahn C.Y., Jin S.O., Lim J.Y., Kim K.H., Lee J.H., Cho T.Y., Lee H.J., Park K.S. and Yoon H.S.: Identification of Raw Materials in Processed Meat Products by PCR Using Species-Specific Primer, *J. Fd Hyg. Safety*, **27**, 68-73 (2012).