

종 특이 프라이머를 이용한 서울시 유통 식육가공품의 사용원료 판별

축산물관리팀

곽정연* · 손장원 · 최태석 · 손홍락

Identification of Raw Materials in Processed Meat Products in Seoul by Using PCR with Species-Specific Primers

Livestock Management Team

Jeong-yeon Kwak*, Jang-won Son, Tae-seok Choi and Hong-rak Son

Abstract

In this study, PCR test kits were used to identify four animal species(cow, pig, chicken, and duck[horse]) in meat products in Seoul during 2015 ~ 2016. The products showed species-specific DNA fragments of 131, 136, 281, and 191(142) bp from cow, pig, chicken, and duck(horse) meat, respectively. In this study, 73 samples of ham, 54 samples of dried meat, 28 samples of ground meat, 21 samples of sausages, 10 samples of bacon, 9 samples of seasoned meat, and 1 sample of meat extraction processed meat were analyzed. The PCR results showed that all the samples contained the declared raw meat species however, 23(11.7%) of 196 samples also had undeclared meat products. Thus, the products should be marked correctly. In this study, species-specific primers were used, and it was difficult to judge whether the amplification product of a specific species was attributable to the mixing of raw materials or addition of seasoning species. Therefore, a new method for the differentiation of various processed meat products needs to be developed.

Key words : processed meat products, raw materials, PCR, species-specific primer

서 론

최근에는 반쯤되거나 유통기한이 얼마 남지 않은 육류를 식품원료로 사용하거나 돼지고기에 붉은 색소를 첨가하여 소고기를 사용한 것처럼 보이도록 떡갈비를 제조하는 등의 가짜식품의 제조, 유통으로 인하여 식품전반에 대한 소비자의 불신이 커지고 있다. 식육가공품에 혼입된 육류의 감별은 알레르기반응 유발이나 종교적인 이유로 특정 육류만을 소비하는 소비자에 있어 중요하며(1), 소비자의 알권리와 유통 식품에 대한 신뢰도 확보를 위해서도 정확한 표기가 이루어져야 한다.

식육가공품의 사용원료 확인을 위해서는 “품목 제조보고관리대장”을 확인하는 방법이나 육안 분석방법이 있다(2). 하지만 수입육 또는 국산육의 식육 형태 다양화로 인해 종 고유의 조직학 및 해부학적 특성이 없어지면서 저가의 육류가 혼입되기 쉬우며(3), 가공식품 중 사용원료의 부정확한 표시나 제조과정 중 원재료 외의 원료들의 비의도적 혼입을 통제하기 위해서는 제품에 함유된 원료 물질을 모니터링 할 필요성이 있다.

또한 최근 육류 식육가공품 산업의 발달에 따라 다양한 식육가공품이 유통되고 있으며, 이런 과정에서 저가의 고기가 가공품의 원료로 사용될 경우 이를 과학적으로 식별할 필요성이 대두되었다.

식육가공품의 동물 종 판별에 효과적인 방법으로는 mt DNA를 이용하는 실험법이 있으며(4), mt DNA는 모계 유전방식으로 다음 세대로 전달되며, 세포질에 존재하는 한 개의 mt DNA는 핵 DNA보다 세포 당 copy number가 많아 실험에 많이 이용되고 있다.

또한 식육가공품에 사용된 원료육의 동물 종 감별 방법은 분자생물학적 분석기술의 발달에 따라 DNA의 염기서열 차이에 기초한 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법이 기존의 단백질 수준에서의 종 감별의 한계를 극복할 수 있는 새로운 방법으로 활용되고 있다(5). 단백질 수준의 검사 방법은 식품 처리 과정 중에 수용성 단백질의 변성 때문에 열처리된 식품 검사에서 제약이 따르기 때문이다(6).

따라서 본 연구에서는 종특이 프라이머를 이용

한 PCR 방법을 통해 식품원료의 진위여부를 확인하고자 하였다. 종 특이 PCR 방법은 프라이머를 설계하여 PCR 후 최종산물의 생성유무로 판별하는 방법이다. 장점으로는 짧은 시간 내에 가공식품처럼 주형유전자의 크기가 작은 경우에도 적용이 가능하다는 점이다(7). 단점으로는 설계된 프라이머가 유사 종에서도 증폭 가능성이 있어 프라이머 설계와 유사종에 대한 검증작업이 필수적이라는 것이다(8).

또한 이번 연구에서는 mitochondrial DNA 유전자 중 16S rRNA 유전자의 동물 종 간 염기서열의 변이를 이용하여 국내에서 주요 소비되는 소, 돼지, 닭, 오리(말)를 이용한 식육가공품 원료육의 사용실태에 대해 연구하고자 하였으며, 서울시내 유통 중인 다양한 식육가공품을 대상으로 사용된 원재료 및 그 외 육류의 혼입실태조사를 통하여 원료육의 올바른 표기가 이루어지고 있는지를 확인하고, 부적절한 표기 및 의도적인 저가육 혼입에 대한 대책에 대해 생각해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

2015년부터 2016년까지 서울지역에서 유통되었던 식육가공품 196건을 대상으로 하였으며, 그 중에서 햄류 73건, 건조저장육류 54건, 분쇄가공육 제품 28건, 소시지류 21건, 베이컨류 10건, 양념육류 9건, 식육추출가공품 1건에 대하여 실험하였다. 식육가공품의 원료육은 제품의 표시사항 중 원재료명을 참고하여 실험하였으며, 그 외 알레르기유발물질 표시 및 병행생산 제품에 대한 안내를 참고로 하였다.

2. Genomic DNA 추출

Powerprep™ DNA extraction from food and feed(Kogenebiotech)를 사용하여 DNA를 추출하였으며, 추출 방법은 제조사에서 제공하는 방법에 의거하여 추출하였다. 추출된 DNA는 NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)를 이용하여

여 260 : 280 nm에서 정량하여 실험에 사용하였다.
50~100 ng 농도의 DNA를 PCR에 이용하였다.

3. 프라이머

본 연구에 사용된 오리, 소, 돼지, 닭, 말 각각의 종특이 프라이머를 표 1에 나타내었다.

4. Polymerase Chain Reaction(PCR)

오리, 닭, 소, 돼지의 식육가공품에 대하여 국내에서 상용화되어 판매되고 있는 식육감별용 single PCR법인 Powercheck Animal Species ID Kit™(Kogenebiotech)을 구입하여 실험을 실시하였다. 반응조건은 표 2와 같다. 유전자증폭기는

Table 1. Information of species-specific primers in this study

Item	Amplicons size(bp)	Name	Primer Sequence(5'-3')	Remarks
Chicken	281	SFI11-Cfi-F	CCT AAA GAC ACC CAC CTT TGT	16S rRNA
		SFI11-Chi-R	CCG TAG GAG GAT AGG TTC CAG A	
Horse	142	SFI11-Hor-F	TAC AAC CTT CAT TAG AGA GTA AGA ACA AG	16S rRNA
		SFI11-Hor-R	CAG TAT GAG ATT AGG AGT TAG TT	
Cow	131	SFI11-Cow-F	TAT CTT GAA CTA GAC CTA GCC CAA TG	16S rRNA
		SFI11-Cow-R	GGT ACT TTC TCT ATA GCG CCG TAC	
Pig	136	SFI11-Pig-F	CAA CCT TGA CTA GAG AGT AAA ACC	16S rRNA
		SFI11-Pig-R	GGT ATT GGG CTA GGA GTT TGT T	
Duck	191	SFI11-Duc-F	CCC AGA ACC ACA ATG AGA TGA TTA AG	16S rRNA
		SFI11-Duc-R	GTA AGG GAT TCA TCT TGT TTT GGC	

Table 2. Information of PCR condition of used in this study

Target	Step	Temp.	Time	Cycle
Duck/Cow/Pig/Chicken (2016)	Initial denaturation	95℃	10 min	1
	Denaturation	95℃	30 sec	
	Annealing	59℃	10 sec	32
	Extention	72℃	30 sec	
	Elongation	72℃	5 min	1
Horse/Cow/Pig (2015)	Initial denaturation	95℃	10 min	1
	Denaturation	95℃	30 sec	
	Annealing	59℃	10 sec	40
	Extention	72℃	40 sec	
	Elongation	72℃	5 min	1
Chicken (2015)	Initial denaturation	95℃	10 min	1
	Denaturation	95℃	30 sec	
	Annealing	62℃	5 sec	40
	Extention	72℃	30 sec	
	Elongation	72℃	5 min	1

US/PTC-0220G(Bio-RAD)를 사용하였다.

5. 결과확인

최종산물의 확인은 반응액 5 μ l를 취하여 Midori Green Advanced DNA Stain을 첨가하여 만든 아가로스 젤에 100 V, 30분간 전기영동하고 marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다. 전기영동이 끝난 것은 UV투영기(BIO-RAD, USA)

를 이용하여 결과를 확인하였다. PCR 결과 음성 대조군에서 PCR 증폭이 없고 양성대조군에서 정상적으로 증폭이 일어나며 분석한 시료에서 PCR 증폭이 나타났을 경우, 양성대조군과 비교하여 시료의 증폭 size가 일치하면 해당 동물성분이 검출된 것으로 판정하였다. 각각의 동물 중에 대하여 양성대조군, 음성대조군, 분석 시료에 대한 PCR 결과 판독의 예시를 그림 1과 그림 2에 나타내었다.

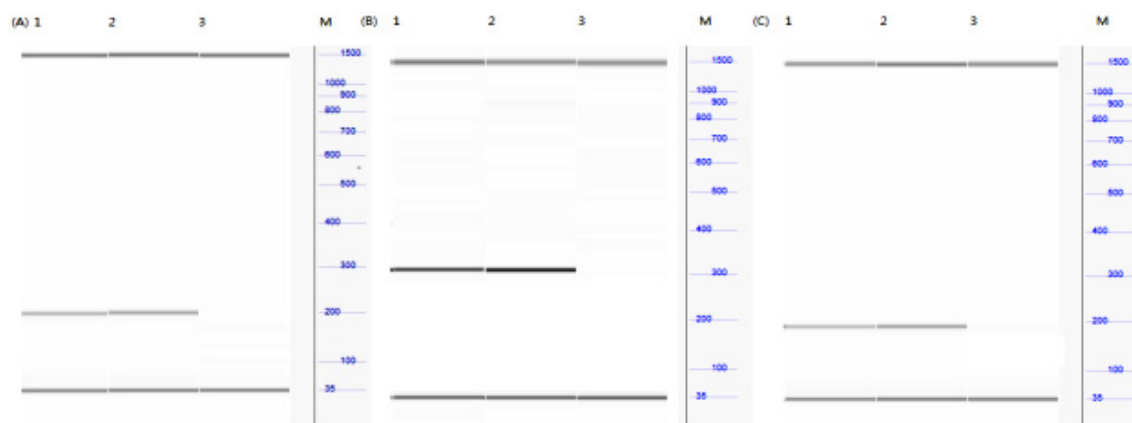


Fig. 1. Detection of pig, chicken and cow from processed meat product by PCR using species-specific primer[Pig(A), Chicken(B), Cow(C)] Lane 1 : Positive sample, 2 : Positive control, 3 : Negative control, M : DNA ladder.

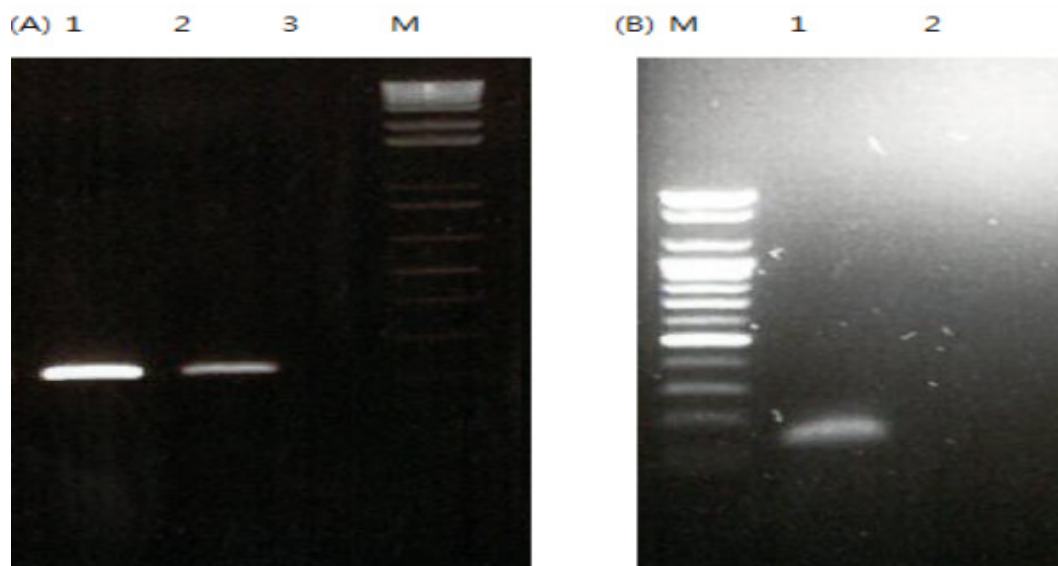


Fig. 2. Detection of duck and horse from processed meat product by PCR using species-specific primer[Duck(A), Lane 1 : Positive sample, 2 : Positive control, 3 : Negative control, M : DNA ladder, Horse(B), Lane 1 : Positive control, 2 : Negative control, M : DNA ladder.].

결과 및 고찰

식육가공품의 원료육 확인을 위하여 양성대조군 및 음성대조군을 함께 증폭하였으며, 양성대조군은 소고기, 돼지고기, 닭고기, 오리고기, 말고기 각각 131, 136, 281, 191, 142 bp의 PCR 산물

이 생성되었다. 유형별로 검사한 결과는 표 3과 같다.

1) 햄류

총 73건에 대해 실험하였으며, 그 중 돼지가 주 원료인 햄류가 55건, 돼지와 닭이 주원료인 햄류

Table 3. Identification of animal species using species-specific primer in processed meat products

Item	Raw material species	No. of raw material detection	Additional species detection	Detection rate (%)
Ham	Pig	55	46	
	Chicken	8	6	
	Pig+Chicken	7	7	
	Duck	3	3	
Subtotal		73	62	85
Dried meat	Cow	45	44	
	Pig	4	3	
	Cow+Pig+Chicken	3	0	
	Chicken	2	1	
Subtotal		54	48	89
Ground meat	Pig	11	11	
	Chicken	6	5	
	Cow	5	5	
	Cow+Pig	4	4	
	Pig+Chicken	2	2	
Subtotal		28	27	96
Sausage	Pig	19	19	
	Pig+Chicken	2	2	
Subtotal		21	21	
Bacon	Pig	10	10	100
Seasoned meat	Pig	3	3	
	Chicken	3	2	
	Cow	3	2	
Subtotal		9	7	78
Meat extraction processed meat	Pig	1	1	100
	Total	196	176	89.8

가 7건, 닭이 주원료인 햄류가 8건이었으며, 오리
가 주원료인 햄류가 3건이었다. 햄류의 경우 62건
에서 원료육 이외의 육류의 유전자가 검출되었으
며, 그 중 8건은 첨가물에 의한 검출이었으며, 35
건은 다른 제품과 공정라인을 함께 사용함에 따라
나타나는 검출이었다. 16건은 우유나 계란 등의
첨가물 뿐 아니라 타 육류와 같이 생산됨에 따라
원료육 이외의 유전자가 검출되었다. 오리로 만든
햄류 3건에 대한 검사 결과 우유, 쇠고기 포함에
따른 소고기 유전자가 검출되었다. 그리고 추가로
닭 특이 유전자가 검출되었으나, 업체에 확인 결과
닭고기, 돼지고기를 사용한 제조시설에서 오리로
만든 햄 제품을 병행 생산 중이라고 소명되었다.

2) 건조저장육류

총 54건의 건조저장육류 중 45건이 소가 주원
료, 4건이 돼지가 주원료, 3건이 소, 돼지, 닭이
주원료였으며, 2건은 닭이 주원료였다. 54건 중
48건의 건조저장육류에서 원료육 이외의 종이 검
출되었다. 그 중 33건은 첨가물이나 타 제품과의
제조시설을 같이 사용한 것에 대한 표기가 이루어
졌으나, 15건은 정확한 표기가 이루어지지 않았
다. 소고기 육포에서 닭 특이 유전자가 검출된 것
이 10건이었으며, 닭과 돼지 특이 유전자가 검출된
것이 4건이었다. 또한 닭고기 육포에서 돼지와 소
특이 유전자가 검출된 것이 1건이었다. 하지만 육
포의 경우 육포시즈닝이나 복합조미식품 등 시즈

닝 종류의 첨가가 많고, 시즈닝에 대한 자세한 성
분표기가 이루어지지 않아 첨가물에 의한 검출인
지 저가의 육류의 혼입인지의 판단 여부가 어렵다.

3) 분쇄가공육류

총 28건의 분쇄가공육류 중 11건이 돼지, 6건이
닭, 5건이 소가 주원료였으며, 돼지와 소가 주원료
인 것이 4건, 돼지와 닭이 주원료인 것이 2건이었
다. 25건의 분쇄가공육에서 주원료 외의 종의 유
전자가 증폭되었다. 23건은 다른 종류 육류 사용
에 대한 표기가 이루어졌으나, 2건은 명확하지 않
았다. 이 중 돼지고기와 소고기가 원료식육인 떡
갈비 1건에서 닭 특이 유전자가 검출되었으나, 닭
고기 제품도 함께 제조하는 시설에서 만들어진 제
품으로 제조시설 사용에 따른 검출로 사료되나,
포장에 제조시설에 대한 표시가 되어있지 않았다.
또한 돼지고기가 주원료인 치즈 돈까스 1건에서
닭 특이 유전자가 검출되었다.

4) 소시지류

총 21건의 소시지류 중 19건이 돼지가 주원료였
으며, 돼지와 닭이 섞인 소시지류는 2건이었다.
21건 모두 원료육 이외의 육류에 대한 증폭산물이
나타났다. 2건은 쇠고기분말과 난백이 섞여 있었
으며, 13건은 다른 제품과 제조시설을 같이 사용
해서 다른 종의 유전자가 증폭되었다. 6건은 난백
이나 치즈 등의 첨가와 제조시설을 같이 사용해서

Table 4. Ingredients on the label of processed meat products

	Type of meat product							Total
	Ham	Dried meat	Ground meat	Sausage	Bacon	Seasoned meat	Meat extraction processed meat	
Additives	8	0	6	2	3	0	0	19
Produced on shared equipment with another species	35	31	11	13	4	4	1	99
Additives+Produced on shared equipment with another species	16	2	8	6	3	0	0	35
No labelling	3	15	2			3		23
Total	62	48	27	21	10	7	1	176

다른 종의 유전자가 나타났다.

5) 베이컨류

총 10건의 베이컨류는 모두 돼지가 주원료였다. 10건의 베이컨류 모두 원료육 이외의 증폭산물이 나타났는데, 이 중 3건은 우유나 계란 첨가로 인해 나타났으며, 4건은 다른 제품과 같은 제조시설을 사용함에 따라 증폭산물이 나타났다. 나머지 3건은 계란이나 우유 첨가 뿐 아니라 다른 제품과 제조시설을 같이 사용함에 따라 증폭되었다.

6) 양념육류

소 3건, 닭 3건, 돼지 3건으로 총 9개의 양념육류에 대해 실험하였다. 그 중 돼지고기 양념육 2건에서 닭 특이 유전자가 검출되었으며, 소고기 양념육 1건에서 닭 특이 유전자가 검출되었다. 하지만 이 3건의 양념육은 닭을 이용한 양념육과 같은 제조시설에서 생산되었으나, 제조시설에 대한 사항이 표시되어 있지 않았다.

7) 식육추출가공품

돼지가 주원료인 1건의 식육추출가공품에 대해 실험하였다. 소고기와 닭고기에 해당하는 증폭산물이 추가로 검출되었으며, 난류, 우유와 같은 제조시설에서 생산된 것으로 표기되어 있었다.

본 연구는 2015년 돼지, 닭, 소, 말고기 4종에 대해 원료육의 검출과 그 외의 축종에 대한 검출 여부를 검사하였으며, 그 중 말고기의 검출은 없었다. 따라서 2016년에는 실생활과 관련이 적은 말 유전자 항목을 폐지하고 오리 유전자 항목을 새로 도입하여 검사를 하였다. 원료육으로 사용된 종 이외 오리 유전자가 검출된 경우는 없었으며, 다만 오리로 만든 햄류 3건에서 닭유전자가 검출되었으나, 후에 닭고기와 제조시설을 함께 사용하는 것으로 소명되었다.

식품의 포장지에 같은 제조시설을 이용한 제품에 대한 정확한 표기가 이루어지지 않은 경우가 있는데 식품의 포장지 표시사항 중 알레르기 원료에 대한 내용은 법적표시내용이나, 닭고기, 돼지고기, 쇠고기 등 다른 육제품과 같이 생산되어 있다

는 내용은 2016년 현재 법적 의무사항이 아니며, 2017년 의무 적용사항으로 개선될 예정이다.

식품은 다양한 매트릭스를 가지고 있으며 가공 과정 중 주형유전자의 파괴가 일어날 가능성이 높기 때문에 종특이 프라이머를 설계하여 PCR 후 PCR 산물의 생성유무로 원료성분을 판별하는 방법에 대한 연구가 다수 보고되었다(9, 10). 추가적으로 가공방법, 종류 등에 따른 효과적인 유전자 추출을 위해 가공식품 유형별 유전자추출법의 확립 또한 필요하다고 생각된다.

서울지역 대형마트 등에서 유통되는 식육가공품의 사용원료 실태조사에 대한 연구가 2014년 있었으며(11), 234건의 식육가공품 중 83건에서 추가종의 혼입이 확인되었으며, 4건만이 미표시 제품이었다. 본 연구에서는 196건 중 175건에서 추가종이 혼입되었으며, 그 중 미표시 제품은 23건이었다. 이는 재료로 사용된 식육가공품 품목에 따라 다양한 개수가 연구됨에 따라 연구결과가 다르게 나온 것으로 사료되며, 추후 식육가공품 품목에 따라 개수를 일치시켜 실태조사를 함으로서 시중 유통 식육가공품의 사용원료에 대한 기초자료로 사용될 수 있으리라 생각된다.

결론

본 연구 결과 식육가공품 196건 중 176건에서 한 종 이상의 식육이 사용되었으며, 이 중 153건은 사용한 원료육의 종류가 적합하게 표시되어 있었다. 표시가 부적절한 나머지 23건 중에서 분쇄가공육 15건은 시즈닝 등의 첨가물에 의한 것으로 보이나 표시가 적합하지 않았고, 분쇄가공육 2건과 양념육 3건, 햄 3건은 병행 생산에 대한 표시를 하지 않은 것으로 확인되었다.

종 특이 프라이머를 이용한 본 연구에서는 특정 종에 의해 생성되는 증폭산물이 원료육 혼합에 의한 것인지, 시즈닝 류의 첨가물에 의한 것인지 판단하기 어렵다. 또한 다른 육류의 병행 생산에 의한 교차오염에 의해서도 원료육 이외의 육류에 대한 증폭산물이 나타날 수 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해서는 다른 축종에 대한 검출

뿐만 아니라 검출량에 대한 정량적인 검사 또한 필요하다 고 생각된다. 2013년 real-time PCR을 이용하여 국내에서 유통되는 햄과 소시지 등 식육가공품 중 돼지고기만을 사용한 제품에 닭고기 함유 여부와 정량검사를 한 보고가 있었다(5). 정량검사 및 표시사항에 기재된 성분과의 연관성 조사가 필요하다고 생각되며, 검출량에 따라 제조시설의 부적절한 관리에 의한 비의도적인 오염인자, 값싼 원료육을 의도적으로 혼합하였을 가능성이 있을 것으로 추정할 수 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

소비자에게 안전하고 신뢰성 있는 식품을 공급하기 위해서 식품제조업체는 제품생산에서 원료육, 시설, 품질 및 표시사항 관리를 엄격히 시행하여 믿을 수 있는 제품을 생산할 수 있도록 좀 더 세심한 주의를 기울여야 할 것이며, 기계 등의 세척관리, 가공공정 개선으로 제품 간 교차 오염이 발생하지 않도록 예방대책을 수립해야 할 것으로 사료된다.

또한 축산식품의 표시사항 위반에 대한 점검을 실시할 경우 실험실 검사뿐 아니라 현장 조사를 병행 실시하여 다른 축종의 식육 DNA가 교차오염에 의한 것인지를 종합적으로 판단해야 할 것으로 사료된다.

또한 마트나 백화점에 진열된 대기업의 공장제품보다 실제 정육점, 가공장 등에서 직접 만든 제품을 주로 검사하여 저가육의 의도적인 첨가가 있을 경우 결과에 대한 행정지도가 가능하도록 해야 한다.

참고문헌

1. 고바라다, 김지연, 나호명, 박성도, 김용환 : 식육감별을 위한 미토콘드리아 12S rRNA와 16S rRNA 유전자의 종특이적 multiplex PCR기법 개발. 한국가축위생학회지. 34(4): 417~428. 2011.
2. 박용춘, 안치영, 진상욱, 임지영, 김규현, 이재황, 조태용, 이화정, 박건상, 윤혜성 : 종 특이 프라이머를 이용한 식육가공품 사용원료 판별법. 한국식품위생안전성학회지. 27(1):68~73. 2012.
3. 박용춘, 김미란, 임지영, 박영은, 신준호, 황초롱, 임잔디, 김규현, 이재황, 조태용, 이화정, 한상배 : 식육추출가공품 사용원료 확인을 위한 유전자추출 방법의 비교 및 검토. 한국식품위생안전성학회지. 27(2):146~151. 2012.
4. Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncales P, Lopez-Perez MJ and Perez-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.
5. 박용춘, 진상욱, 임지영, 김규현, 이재황, 조태용, 이화정, 한상배, 이상재, 이광호, 윤혜성 : 일반 프라이머를 이용한 PCR의 식품원료 진위 판별에 적용. 한국식품위생안전성학회지. 27(3):317~324. 2012.
6. 고바라다, 김지연, 나호명, 박성도, 김용환 : 돼지고기 제품 내 닭고기 검출을 위한 TaqMan[®] real-time PCR의 적용. 한국가축위생학회지. 36(3):193~201. 2013.
7. 허은정, 고은경, 서건호, 김영조, 박현정, 위성환, 문진산 : 국내 유통 식육 및 식육가공품에서 축종감별을 위한 PCR 및 ELISA 검사법 검증. 한국식품위생안전성학회지. 29(2):158~163. 2014.
8. 김규현, 이호연, 김용상, 김미라, 정유경, 이재황, 장혜숙, 박용춘, 김상엽, 최장덕, 장영미 : 종 특이 프라이머를 이용한 동물성 식품원료의 진위 판별법 개발. 한국식품위생안전성학회지. 29(4):347~355. 2014.
9. Lee, JH, Song, KY, Hyeon, JY, Hwang, IG, Kwak, HS, Han, JA, Chung, YH and Seo, KH : Comparison of standard culture method and real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* in processed and unprocessed foods. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 30:410~418. 2010.

10. Lee SY, Jang KI, Woo GJ, Kwak, HS and Kim, KY : Development of protocol for the effective detection of Feline Calicivirus as Norovirus surrogate in oyste and lettuce. Korean J. Food Sci. Technol. 39:71~76. 2007.
11. 박소현, 최영희, 박영애, 정소영, 홍채규, 김연천, 김정현, 정권 : 유전자분석을 이용한 시중유통 식육가공품의 사용원료 실태조사. 서울특별시보건환경연구원보. 50:51~60. 2014.