pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 4, pp. 289~297 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.4.289

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Multiplex PCR과 Real-Time PCR을 이용한 창난젓과 가이양젓 원료 검사법 개발

최성석[1] · 서용배[1] · 김종오[2] · 양지영[3] · 신지영[4] · 김군도[5]*
[1]부경대학교 기초과학연구소, [2]부경대학교 해양생명과학연구소, [3]부경대학교 식품공학과,
[4]부경대학교 식품연구소, [5]부경대학교 미생물학과

Development of Raw Material Identification Method of Changnan-jeot and Gaiyang-jeot Using Multiplex PCR and Real-Time PCR

Seong Seok Choi[1], Yong Bae Seo[1], Jong-Oh Kim[2], Ji-Young Yang[3], Jiyoung Shin[4], Gun-Do Kim[5]*
[1]*Basic Science Research Institute, Pukyong National University, Busan, Korea*
[2]*Institute of Marine Biotechnology, Pukyong National University, Busan, Korea*
[3]*Department of Food Science & Technology, Pukyoung National University, Busan, Korea*
[4]*Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan, Korea*
[5]*Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan, Korea*

(Received June 1, 2021/Revised August 8, 2021/Accepted August 9, 2021)

ABSTRACT - In this study, multiplex PCR and real-time PCR were performed on *Theragra chalcogramma* (walleye pollock), *Pangasianodon hypophthalmus* (iridescent shark) and their processed foods, such as *changnan-jeot* and *gaiyang-jeot* (salted iridescent shark intestine). Species-specific primers for *T. chalcogramma* and *P. hypophthalmus* were designed, and genomic DNA was directly extracted from each sample to perform single PCR and multiplex PCR. As a result of PCR, in the case of single PCR, PCR bands of *T. chalcogramma* (297 bp) and *P. hypophthalmus* (132 bp) were identified, and in the case of multiplex PCR, it was confirmed that amplification occurred without cross-reaction between *T. chalcogramma* and *P. hypophthalmus*. As a result of checking the PCR sensitivity, the concentration of genomic DNA was detected up to 0.1 ng/μL in both single PCR and multiplex PCR. The real-time PCR results showed that the average Ct value of *T. chalcogramma* was 20.765±0.691, and the average Ct value of *P. hypophthalmus* sample was 35.719±1.828 in the *T. chalcogramma* species-specific primers. In the *P. hypophthalmus* species-specific primers, the average Ct value of the *T. chalcogramma* sample was 35.996±1.423, and the mean Ct value of the *P. hypophthalmus* sample was 20.096±0.793. These results demonstrated the significant differences in the efficiency, specificity and cross-reactivity of species-specific primers in real-time PCR. Based on these findings, 7 of changnan-jeot or *gaiyang-jeot* products were confirmed by multiplex PCR and real-time PCR, and valid results were confirmed in all samples.

Key words : Multiplex PCR, Real-time PCR, Changnan-jeot, *Theragra chalcogramma*, *Pangasianodon hypophthalmus*

한국을 비롯한 일부 아시아 국가에서는 기호 식품으로 젓갈류를 만들어 애용하여 왔다. 젓갈은 어패류의 근육이나 내장 등에 다량의 소금을 처리하여 부패를 막고 숙성시켜 숙성 과정 중 미생물에 의한 발효 또는 자가소화효소에 의해 단백질이 분해되어 풍미를 나타내게 만든 전통식품이다. 한국의 전통 젓갈은 약 100 여종이 되는 것으로 알려져 있다. 이러한 젓갈 중 동해에서 높은 어획량을 보이던 어종인 명태를 이용한 젓갈도 있으며, 명태를 이용한 젓갈로는 명란젓, 서거리젓 그리고 창난젓 등이 있다. 특히 창난젓은 명태의 위와 창자로 담근 젓갈로 특유한 풍미와 조직감으로 잘 알려진 수산물 발효 식품이다[1].

창난젓의 원료가 되는 명태는 1976년부터 1985년까지 연평균 10.7만톤의 어획량을 기록하였으며, 이는 동해 연근해 어업량의 약 44%를 차지할만큼 어획량이 높았다. 하

*Correspondence to: Gun-Do Kim, Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
Tel: +82-51-629-5618, Fax: +82-51-629-5619
E-mail: gundokim@pknu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지만 명태와 명태 미성어인 노가리의 남획, 수온의 상승에 따른 한류성 어종인 명태의 어장 이동 등의 이유로 1980년대 후반부터 명태의 어획량은 급감했으며, 2000년대 후반부터 한국에서는 잡히지 않는 어종이 되었다[2]. 이와 같은 이유로 현재 국내에 유통되는 명태는 대부분 러시아나 미국 알래스카로부터 수입되고 있으며, 창난젓의 원료가 되는 명태의 내장 역시 수입에 의존하고 있다.

식생활의 변화에 따른 수산물과 수산물 가공 식품에 대한 수요가 증가하면서 가공 식품에 대한 규제가 강화되었다[3]. 하지만 가공 식품은 형태학적 분류가 힘들어 부정식품으로 제조 및 유통될 수 있는 잠재적인 위해 요소를 가지고 있다. 특히, 젓갈의 경우 어류의 내장이나 생식소로 만들기 때문에, 그 형태만으로 원재료를 구분하기 어렵다. 대표적인 예로 동남아시아에 서식하는 가이양의 내장으로 제조한 젓갈을 창젓이라는 이름으로 판매하여 창난젓과 혼동을 주는 경우가 있으며, 표시 성분에는 가이양으로 되어 있지만 제품명이 창난젓으로 표기되어 유통되는 사례도 있다. 더 나아가 표시 성분도 속이고 가이양 내장으로 제조한 젓갈을 창난젓으로 판매하다 적발된 사례도 존재한다.

가공 식품 중 값싼 원료를 사용하고 잘못된 영양 정보와 원재료명을 기입하는 등 소비자를 기만하는 행위를 근절하기 위해 부정 식품 판별을 위한 판별법을 개발하고 이를 적용한 검사지침을 마련하는 것이 시급하다. 그 중 DNA를 활용한 분자생물학적 검사법은 종 구분과 유사 종간 유전적 유연 관계를 연구하기 위해 많이 활용되고 있다[4].

진핵생물의 미토콘드리아는 독립적인 DNA를 가지고 있으며, 약 16,000 bp의 크기를 가지고 있다. 미토콘드리아 DNA는 돌연변이가 일어날 확률이 높기 때문에 유사종 사이에서 종 구분에 사용되어 왔다[5,6]. 특히, 미토콘드리아는 세포 내에서 높은 복제 수를 가지고 있기 때문에 식품 가공 등에 의한 DNA 손상이 일어나거나 낮은 DNA 농도에서도 종 판별에 활용할 수 있다[7]. 미토콘드리아 DNA에는 시토크롬 B (CytB), 시토크롬 C 산화효소(COI, COII, COIII), ATP 합성효소(ATPase 6, ATPase 8) 등의 유전자와 리보솜 RNA (12S rRNA, 16S rRNA), 운반 RNA (tRNA) 등을 포함하고 있으며[8,9], 이들 유전자들 중에서 CytB, COI, 16S rRNA 등이 종 판별을 위해 주로 사용된다[10-13].

가공 식품에 사용한 원료의 판별을 위해 기본적으로 single PCR을 주로 사용되었으며, 종 특이 프라이머를 제작하여 가공 식품 중에 포함된 원료를 판별하였다[9,14,15]. 하지만 검사해야 하는 시료의 수가 많거나, 한 시료에서 검사하고자 하는 항목이 많을 경우 오랜 시간이 소모되기 때문에 single PCR보다 더 빠른 검사법이 요구되어 왔다. 이러한 조건을 충족시키기 위해 한 시료에서 한번에 검사하고자 하는 종 특이 프라이머 세트들을 모두 첨가하여 size variation을 통해 확인할 수 있는 multiplex PCR과, 아가로즈 겔 전기영동 과정 없이 결과를 확인할 수 있는 real-time PCR을 이용한 원료 판별 검사법이 개발되고 있다[16,17].

식품의약품안전처에서 2012년에 발간한 식품 중 사용원료 진위 판별 지침서(II)에는 PCR을 이용한 명태 판별법이 있으며, 2016년에 발간한 식품 중 사용원료 진위 판별을 위한 유전자 분석 방법에는 가이양 판별법이 포함되어 있다[18,19]. 그러나 이들 지침서에서 두 종을 구분하는 PCR 법은 single PCR에 대한 조건이며, 빠른 검사를 위한 multiplex PCR이나 real-time PCR에 적용하기에는 몇가지 문제점이 있다. 지침서에 나와있는 명태와 가이양의 PCR 산물의 크기가 각각 107 bp와 100 bp로 size variation이 고려되어 있지 않아 multiplex PCR에 적용하기 어렵다. 또한 프라이머 결합 온도가 각각 55°C와 62°C로 multiplex PCR이나 real-time PCR에 바로 적용하기에 어려움이 있다.

본 연구에서는 multiplex PCR과 real-time PCR을 활용하여 창난젓의 원료를 감별할 수 있는 새로운 판별법을 개발하였다. 이를 위해 COI에서 종 특이적인 염기서열을 선별하여 프라이머를 제작하였으며, multiplex PCR과 real-time PCR 조건을 확립하였다. 또한, 시중에서 유통되고 있는 창난젓에 적용하여 원료의 종판별을 수행하였다.

Material and Methods

재료 준비

창난젓과 가짜 창난젓의 원료가 되는 명태와 가이양은 각각 디엔델(Donghae, Korea)과, 아쿠아마켓(Bucheon, Korea)에서 구입하였으며, 각 시료의 genomic DNA를 추출하여 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다. 또한, 시중에서 유통되고 있는 창난젓과 가이양 내장젓 제품 7종을 구입하여 젓갈의 원료 판별에 사용하였다. 모든 시료는 -20°C에서 보관하면서 시험에 사용하였다.

Genomic DNA 추출 및 정제

명태 내장과 가이양 내장, 시중에서 구입한 젓갈 제품은 멸균증류수로 3회 이상 충분히 세척하였다. 분석 검체로부터 genomic DNA를 추출하기 위해 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea) 제품을 사용하였다. 추출 방법은 검체 30 mg을 1.5 mL 튜브에 넣고 TL Buffer 200 μL, proteinase K 20 μL, RNase A 10 μL를 첨가하고 Kimble Pellet Pestles (Vineland, NJ, USA)로 조직을 분쇄한 후, 조직이 완전히 분해될 때까지 60°C에서 반응시킨다. 조직이 완전히 용해되면 GB Buffer 200 μL를 첨가하고 vortexing하여 섞은 후, 60°C에서 10분간 반응시킨다. 반응액에 absolute ethanol 400 μL를 첨가하고 vortexing하여 섞는다. 반응액을 spin column으로 옮긴 후, 8,000 rpm에서 1분간 원심분리한다. WA1 buffer와 W2 buffer를 각각 500 μL씩 순차적으로 처리하여

column을 washing한 후, 멸균된 3차증류수 100 μL로 genomic DNA를 추출한다. 추출한 genomic DNA는 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

종 특이 프라이머 설계

종 특이 프라이머는 National Center for Biotechnology Information (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)에 등록되어 있는 명태와 가이양의 COI (Cytochrome oxidase subunit I) 염기서열을 대상으로 제작하였다. 프라이머 디자인을 위해 Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)를 이용하였다. 식품가공 과정 중에 DNA가 손상될 수 있고[20,21], real-time PCR에도 적용하기 위해, PCR product 크기가 100~300 bp 정도가 되도록 디자인하여[22], multiplex PCR과 real-time PCR에 모두 적용하였다.

Polymerase Chain Reaction 조건

PCR 시약은 AccuPower® PCR PreMix (Boneer, Daejeon, Korea)를 이용하였다. PCR 반응 시약에 genomic DNA 1 μL, 프라이머 각 1 μL (0.5 μM)을 혼합하였으며 총 반응 용량은 20 μL가 되도록 3차 증류수를 첨가하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 denaturation을 실시한 후 95°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 30초를 40 cycle 반응시킨 후, 72°C에서 5분간 extension하였다. PCR 반응이 종료된 후 PCR product는 4°C에서 보관하였다.

Single PCR의 경우, 명태 genomic DNA 샘플은 ComCOI-F/TCOI-R1 프라이머 세트, 가이양 genomic DNA 샘플은 ComCOI-F/PCOI-R1 프라이머 세트를 사용하였으며, 두 종의 혼합 genomic DNA 샘플과 젓갈 샘플의 multiplex PCR은 ComCOI-F/TCOI-R1/PCOI-R1 프라이머를 혼합하여 사용하였다. Multiplex PCR에 사용한 template는 명태와 가이양 genomic DNA를 혼합하여 사용하였으며, 젓갈에 대해서는 각각의 제품에서 추출한 genomic DNA를 template로 원료의 종판별에 사용하였다.

Real-time PCR 조건

Real-time PCR 시약은 AccuPower® GreenStar™ RT-qPCR Master Mix (Boneer, Daejeon, Korea)를 이용하였다. Real-time PCR 시약 10 μL, genomic DNA 1 μL, 프라이머 각 1 μL (0.5 μM)을 혼합하였으며 총 반응 용량은 20 μL가 되도록 3차 증류수를 첨가하였다. Real-time PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 denaturation을 실시한 후 95°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 30초를 40 cycle 반응시킨 후, 72°C에서 5분간 extension하였다. Melting curve는 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 반응시킨 후, 60°C에서 95°C까지 0.05°C/s 속도로 온도를 증가시키면서 확인하였다. Real-time PCR의 실험 결과에서 Ct값과 melt curve는 평균값±SD로 나타내었으며, 유의성 검증은 Student's t-test로 확인하였다. 유의 확률이 $P<0.05$ 인 경우 대조군과 실험군 사이에 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

젓갈에 대한 적용성 검토

본 연구에서 디자인된 명태와 가이양에 대한 종 판별 프라이머를 이용하여 실제 젓갈의 적용 가능성를 판단하기 위해 대형 마트에서 창난젓 또는 창젓이라고 표기된 젓갈을 구입한 후, 제품에 표기된 원료의 종 일치여부를 multiplex PCR과 real-time PCR로 확인하였다. 각각의 젓갈에 대한 조성은 Table 1에 명시하였다.

Results and Discussion

명태와 가이양 종 특이 프라이머 디자인

명태와 가이양의 종 특이 프라이머를 디자인 하기 위해

Table 1. Component information of *changnan-jeot* and *gaiyang-jeot*

Company	Components
A	Salted pollack intestine (66%), starch syrup (corn), ginger, paprika extract, red pepper powder, garlic, sesame seeds, salted anchovy, sea salt, sodium L-glutamate
B	Salted pollack intestine (64.63%), starch syrup, refined salt, red pepper powder, D-sorbitol, garlic, sugar, radish, L-sodium glutamate, sesame seeds, sauces (seasoning liquid), plum concentrate, complex seasoning food, L-sodium ascorbate
C	pollack intestine (81%), sea salt
D	Salted pollack intestine (73%), starch syrup, red pepper powder, food additives mixture, garlic, ginger, L-sodium glutamate, D-sorbitol, potassium sorbate
E	Salted pollack intestine (78.5%), red pepper powder, rice jocheong, garlic, organic sugar
F	Salted iridescent shark Intestine (53%), scallop (13%), garlic, complex seasoning food (paprica seasoning, (powder crystalline glucose), oleoresin fabrika), polysorbate 80, propylene glycon, grapefruit extract) ginger, sesame, salted anchovy, sea salt, sodium L-glutamate
G	Salted iridescent shark Intestine (30%), scallop (50%), red pepper powder, garlic, seasoned red pepper powder, L-sodium glutamate, alcohol, sugar, starch syrup, ginger

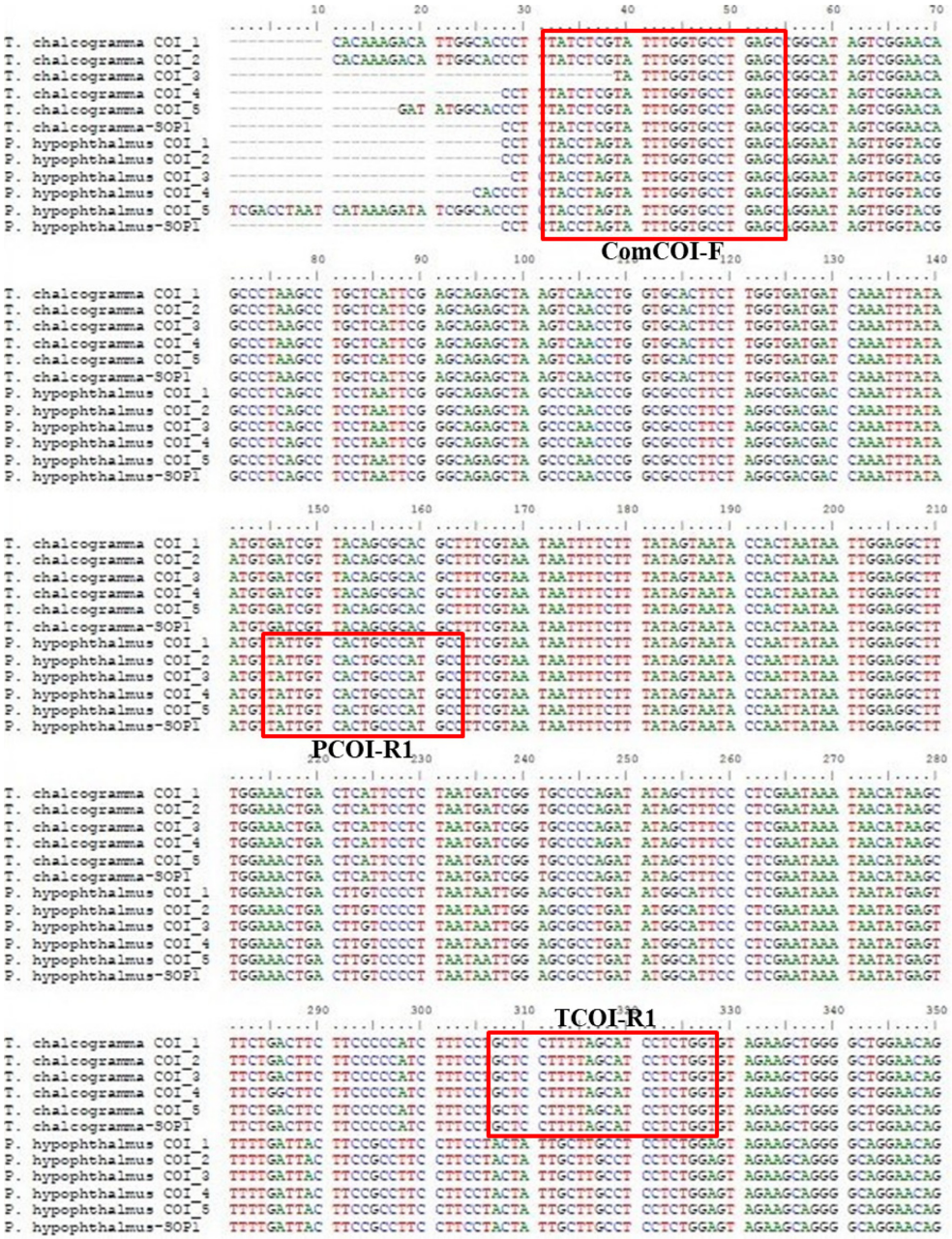

Fig. 1. Nucleotide sequence alignment and primer designed from COI genes of *T. chalcogramma* and *P. hypophthalmus*.

Table 2. Species-specific primer designed for detection of *T. chalcogramma* and *P. hypophthalmus*

Target region	Primer	Primer Sequence (5' → 3')	Length (bp)
COI	ComCOI-F	TAY CTM GTA TTT GGT GCC TGA GC	297
	TCOI-R1	GGC ATG GGC AGT GAC AAT A	
	PCOI-R1	ACC AGA GGA TGC TAA AAG GAG C	132

Primer3Plus 프로그램을 이용하여 디자인하였다(Fig. 1). 프라이머를 디자인할 때, 비용 및 Tm 값의 최적화를 위해 forward primer를 같은 프라이머로 고정하였다. 디자인된 프라이머는 Table 2에 나타내었다.

종 특이 프라이머를 이용한 명태와 가이양 시료 확인

본 연구에서 디자인한 종 특이 프라이머를 이용하여 명태와 가이양으로부터 분리한 genomic DNA를 PCR 하여 종 특이적인 증폭 유무를 확인하였다. 각각의 종에 대한

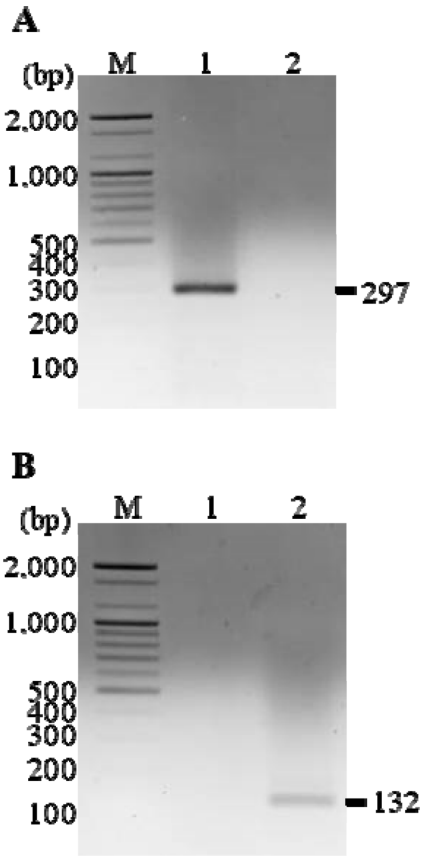

Fig. 2. Single PCR product patterns of COI on mithchondrial DNA using specific primer (A: ComCOI-F/TCOI-R1, B: ComCOI-F/PCOI-R1). Lane M; 100 bp ladder, 1; *T. chalcogramma*, 2; *P. hypophthalmus.*

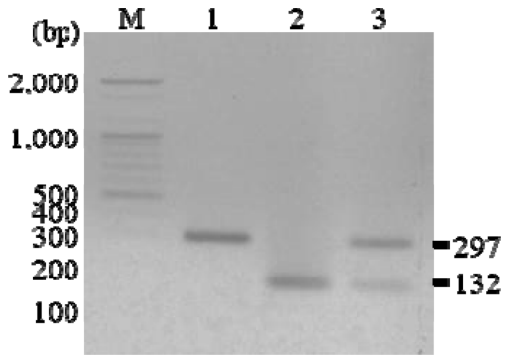

Fig. 3. Multiplex PCR product patterns of COI using specific primer (ComCOI-F/TCOI-R1/PCOI-R1). Lane M; 100 bp ladder, 1; *T. chalcogramma*, 2; *P. hypophthalmus.*

single PCR 결과 명태는 297 bp, 가이양은 132 bp에 PCR 밴드를 확인하였으며, 교차반응에 의한 비특이적 밴드는 나타나지 않았다(Fig. 2). 종 특이 프라이머를 multiplex PCR에 적용한 경우 명태와 가이양 모두 각각의 종 특이적인 증폭이 일어나는 것을 확인하였으며, 두 genomic DNA 혼합 시료에서 두 개의 밴드가 모두 존재하였다(Fig. 3).

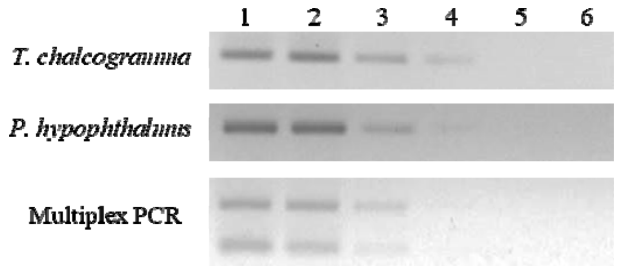

Fig. 4. Sensitivity analysis of the single PCR of *T. chalcogramma* and *P. hypophthalmus*, and multiplex PCR. Genomic DNA were dilluted with lane 1; 100 ng/μL, 2; 10 ng/μL, 3; 1 ng/μL, 4; 0.1 ng/μL, 5; 0.01 ng/μL and 6: 0.01 ng/μL.

Genomic DNA 농도에 따른 PCR 민감도 측정

Genomic DNA 농도에 따른 민감도를 검증하기 위해, genomic DNA를 10배 단위로 희석하여 검출 가능한 한계 농도를 확인하였다. 실험에 사용한 genomic DNA는 각각 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 0.1 ng/μL, 0.01 ng/μL, 0.001 ng/μL 이며, genomic DNA의 농도를 제외한 나머지 PCR 조건은 모두 동일하게 설정하였다. PCR이 끝난 후 PCR product를 agarose gel에 각각 10 μL씩 동일하게 로딩하였다. Genomic DNA 농도에 따른 검출 한계를 확인한 결과, single PCR의 경우 명태와 가이양 모두 0.1 ng/μL의 농도까지 검출이 가능하다는 것을 확인하였으며, multiplex PCR에서도 명태와 가이양의 genomic DNA가 각각 0.1 ng/μL의 농도에서 두 개의 밴드가 동시에 검출되었다(Fig. 4).

젓갈에 대한 Multiplex PCR의 적용

시중에 유통중인 젓갈에 대하여 적용 가능성을 검토하기 위해 총 7개의 창난젓과 가이양 내장젓을 선정하여 multiplex PCR을 수행하였다. 각각의 시료에서 추출한 genomic DNA를 이용하여 multiplex PCR을 수행한 결과, 5개 제품에서 명태에 특이적인 밴드, 2개 제품에서 가이양에 특이적인 밴드를 확인하였다(Fig. 5). 각각의 결과를 제품에 표기되어 있는 표시사항과 비교 하였을 때, 모든 제품에서 원료가 일치하는 것을 확인하였다.

Multiplex PCR을 이용하여 창난젓 원료의 종판별에서 명태와 가이양의 종 특이 프라이머 세트를 이용하였을 때, PCR product의 size variation으로 원료의 종판별이 가능하며, 젓갈에서 분리한 DNA에서도 원료의 종판별이 가능한 것으로 확인되었다. Multiplex PCR은 하나의 PCR product에서 2종 이상의 대상종을 판별할 수 있기 때문에, single PCR과 비교하여 비용이 저렴하고 빠르게 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 multiplex PCR 프라이머를 디자인할 때, 프라이머의 Tm값이 차이가 나지 않아야 하고, 교차 반응에서 비특이적인 PCR 반응이 일어나지 않아야 하는 등 여러 조건을 고려하여야 한다. 우선 NCBI에 등록된 명태와 가이양의 COI 염기서열로 종 특이 프

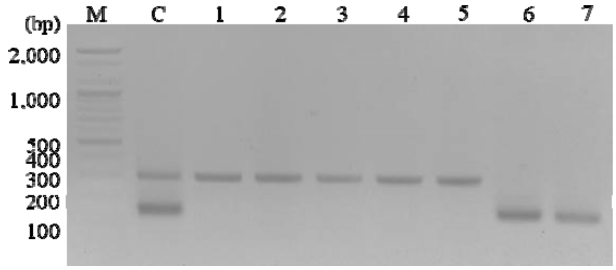

Fig. 5. Multiplex PCR results of 7 products of Changnan-jeot or Gaiyang-jeot. Lane M; 100 bp ladder, Lane C; multiplex marker, 1; company A, 2; company B, 3; company C, 4; company D, 5; company E, 6; company F, 7; company G using specific primers (ComCOI-F/TCOI-R1/PCOI-R1).

라이머를 디자인하여 종에 따른 PCR product의 size variation과 교차반응에 의한 비특이적 반응 유무를 점검하여 종특이성과 활용성을 검증하였다. 또한 실제로 시중에서 유통중인 젓갈로 검증 시험을 수행함으로써 창난젓 원료의 종판별에 대한 적용성을 확인하였다. Multiplex PCR 실험 결과 PCR product의 size variation에 따른 종판별이 가능하였으며, 교차 반응에 의한 비특이적인 밴드가 나타나지 않았다. Multiplex PCR을 이용 창난젓 원료 판별 시험은 single PCR과 비교하여 비용 감소와 빠른 원료 감별이 가능하다고 판단되며, 다른 부정식품 감별의 기초 데이터로 활용될 수 있다.

명태와 가이양의 real-time PCR 확인

명태와 가이양의 각 3개 시료의 genomic DNA를 10 ng/μL의 농도에서 종 특이 프라이머 세트를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 결과를 분석한 결과, 명태 종 특이 프라이머 세트의 real-time PCR에서 명태 시료의 Ct 값 평균이 20.765±0.691, 가이양 시료에서 Ct 값 평균이 35.719±1.828로 분석되었다. 동일한 시료 조건으로 가이양 종 특이 프라이머 세트의 real-time PCR 결과 명태 시료의 Ct 평균값은 35.996±1.423이었고, 가이양 시료의 Ct 평균값은 20.096±0.793이었다. 명태와 가이양의 각 종 특이 프라이머의 특이성 및 교차 반응성 측정은 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(P<0.05). 명태와 가이양 시료의 genomic DNA에서 각 종의 종 특이 프라이머 세트를 사용한 경우에 Ct 평균값은 22 이하로 나타나는 반면, 교차 반응에서는 Ct 값이 30 이상으로 교차 검증의 증폭곡선은 목적종의 증폭곡선과 명확한 차이를 보이고 있다(Fig. 6A, B). 또한, 각 종 특이 프라이머 세트에 의한 melt curve를 분석하더라도 명태 종 특이 프라이머 세트에 대한 명태 시료의 Tm 평균은 84.422±0.071℃인 것과 비교하여 가이양 종 특이 프라이머 세트에 대한 가이양 시료의 Tm 평균은 85.958±0.127℃로 유의적인 차이가 나타났다(P<0.05) (Fig. 6C).

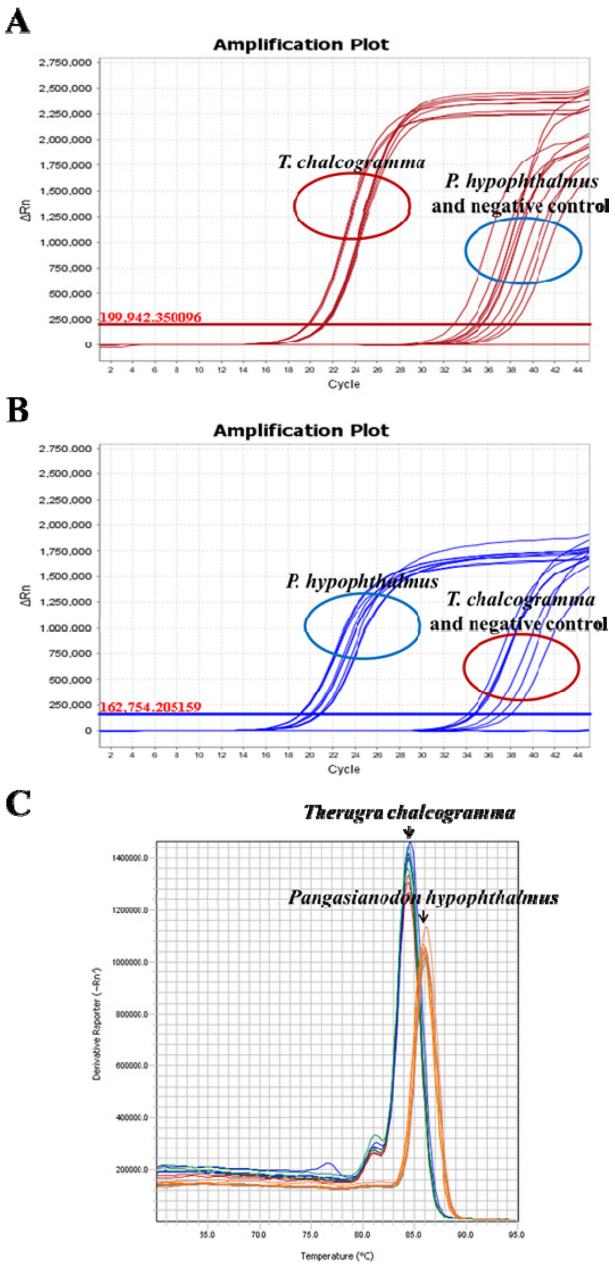

Fig. 6. Real-time PCR results of amplification of genomic DNA extracted from *T. chalcogramma* and *P. hypophthalmus* using ComCOI-F/TCOI-R1 primer set for *T. chalcogramma* (A) and ComCOI-F/TCOI-R1 primer set for *P. hypophthalmus* (B), and melt curve results of ComCOI-F/TCOI-R1 primer set for *T. chalcogramma* and ComCOI-F/TCOI-R1 primer set for *P. hypophthalmus* (C).

젓갈에 대한 real-time PCR의 적용

시중에 유통중인 젓갈 대하여 real-time PCR의 적용 가능성을 확인하기 위해 multiplex PCR에서 사용했던 젓갈 시료를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다(Fig. 7). Real-time PCR 결과를 분석한 결과, 명태 종 특이 프라이머 세트를 사용한 real-time PCR에서 1-5번 젓갈 시료의 Ct값

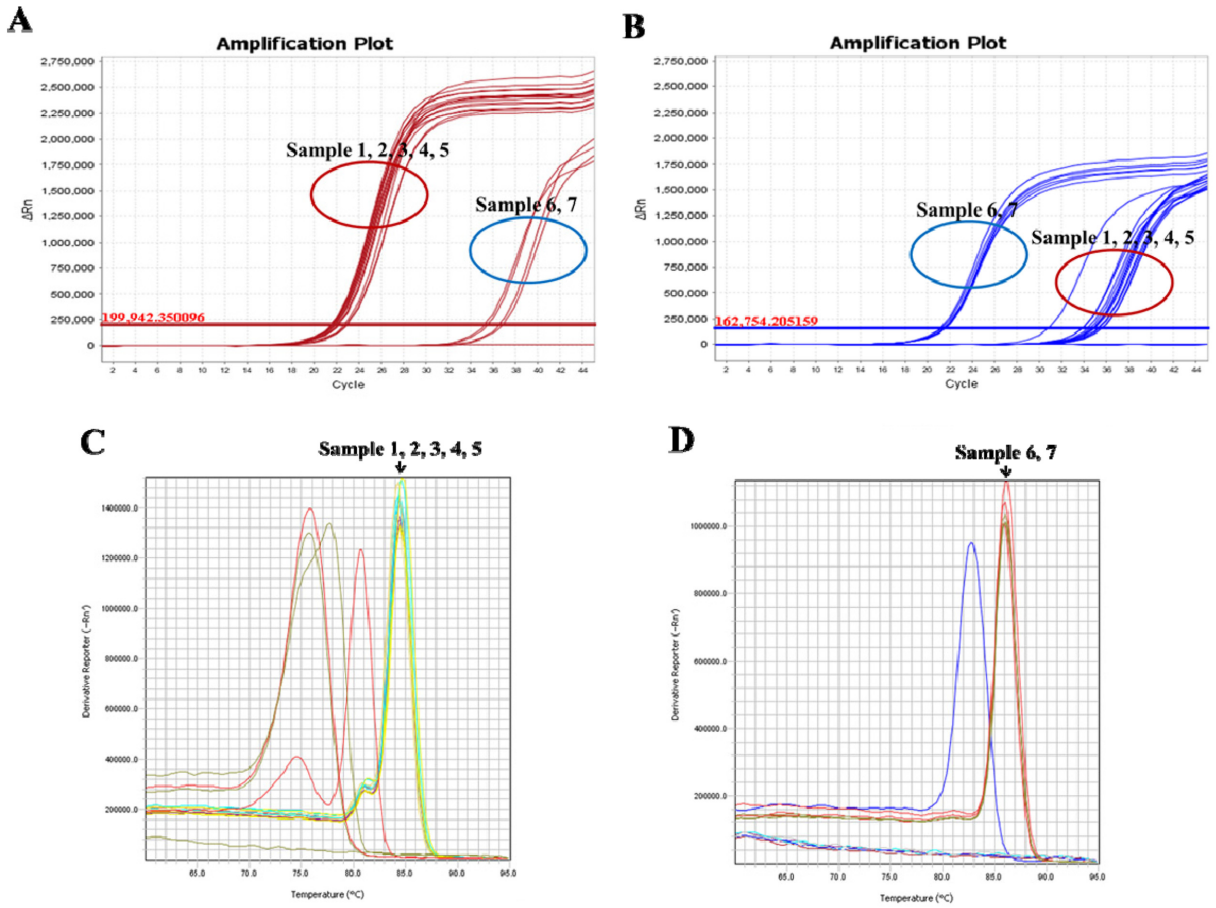

Fig. 7. Real-time PCR results of 7 products of Changnan-jeot or Gaiyang-jeot using ComCOI-F/TCOI-R1 primer set (A) and ComCOI-F/TCOI-R1 primer set (B), and melt curve results of 7 products of ComCOI-F/TCOI-R1 primer set (C) and ComCOI-F/TCOI-R1 primer set (D).

은 각각 22.003±0.156, 22.069±0.180, 21.574±0.051, 21.696±0.068, 22.855±0.124 이었으며, 6번과 7번 시료는 모두 35 이상으로 나타났다. 가이양 종 특이 프라이머 세트를 사용한 경우 Ct 값 결과에서 1~5번 시료는 모두 34 이상이었으며, 6번과 7번은 각각 21.609±0.0857, 21.344±0.185으로 나타났다. 명태 종 특이 프라이머 세트에 대한 melt curve 분석 결과에서 1-5번 시료는 84.4-84.6 사이로 나타났으며, 6번과 7번 시료는 melt curve가 나타나지 않거나 비특이적인 형태로 나타났다. 가이양 종 특이 프라이머 세트에 대한 melt curve 분석 결과에서도 6번과 7번 시료는 각각 86.034±0.000, 86.001±0.112로 나타났으며, 1-5번 시료는 melt curve가 나타나지 않거나 비특이적인 형태로 나타났다. 이러한 결과는 1-5번 시료는 명태, 6-7번 시료는 가이양이 주원료인 것으로 확인되었으며, 제품에 표기되어 있는 표시사항과 일치하였다.

최근에 발표된 연구에서 원료의 판별을 위해 real-time PCR이 이용되고 있으며, real-time PCR을 이용하여 육류 및 수산물 원료의 종 확인이 보고되어 있다. 이들 연구 결과에서 검출 한계 내에서 대상종에 대한 종 특이 프라이머로 real-time PCR을 수행한 경우 Ct 값이 모두 30 이내인 것으로 확인되었으며, 일부 비특이적인 반응의 경우 Ct 값이 32 이상인 것으로 보고되었다[17,23]. 이전에 보고된 연구 결과와 마찬가지로, real-time PCR을 이용한 창난젓 원료의 종 판별법에서 Ct 값과 melt curve를 분석하여 종 판별이 가능하며, 가공 식품인 젓갈에도 적용 가능한 것으로 확인되었다. 특히, 비특이적인 반응은 명태와 가이양 종 특이 프라이머 결과 모두 Ct값이 32 이상인 것으로 나타났으며, 반응 반복횟수를 30회 이내로 축소하면 검출/비검출에 의한 종 판별법으로 적용할 수 있다. 또한, multiplex PCR과 같은 프라이머 세트를 사용함으로써 실험 준비의 간소화 및 비용 절감 효과 등의 이점이 있다. 또한 real-time PCR의 결과의 PCR 반복 횟수 결과를 바탕으로 Ultra-Fast PCR과 같은 현장 단속에 적용할 수 있는 판별법에 대한 기초 자료를 제공할 수 있다.

본 연구에서는 multiplex PCR과 real-time PCR을 이용하여 명태와 가이양의 종 판별법을 개발하였으며, 실제로

시장에서 판매하고 있는 창난젓과 창젓이라는 이름으로 판매되는 가이양 내장젓에 적용하여 젓갈로 가공된 식품에 적용 가능한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 명태와 가이양 이외에 가공 식품의 원료를 판별할 수 있는 종 판별 시스템으로 적용할 수 있으며, 식품 원료의 안전성 확보, 식품 안전 관리, 제조 유통 질서 확립에 따른 소비자 보호와 소비자의 신뢰성 회복에 따른 건전한 소비 구축 등에 기여할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(수산생물 원산지 판별기술 및 현장단속 키트개발)

국문요약

본 연구에서 multiplex PCR과 real-time PCR을 이용하여 창난젓의 원료를 감별할 수 있는 새로운 판별법을 개발하였다. 명태와 가이양의 종 특이 프라이머를 디자인하고, 명태와 가이양의 genomic DNA를 template로 single PCR과 multiplex PCR을 실시하였다. PCR을 실시한 결과, single PCR에서 명태(297 bp)와 가이양(132 bp)에 해당하는 PCR 밴드를 확인하였으며 교차 반응이 일어나지 않는 것을 확인하였다. Multiplex PCR에서 명태와 가이양 사이에 교차 반응 없이 증폭이 일어나는 것을 확인하였다. Real-time PCR 결과, 명태 종 판별 프라이머에서 명태의 Ct 평균값은 20.765±0.691, 가이양 시료에서 Ct 평균값은 35.719±1.828이었으며, 가이양 종 판별 프라이머에서 명태 시료의 Ct 평균값은 35.996±1.423, 가이양 시료의 Ct 평균값은 20.096±0.793으로 프라이머의 효율성, 특이성 및 교차 반응성에서 유의한 차이가 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 시중에서 판매되는 7개 제품을 multiplex PCR 및 real-time PCR로 확인하였으며, 모든 시료에서 유효한 결과를 확인하였다. 본 연구에서 제작된 명태와 가이양에 대한 종 특이적 프라이머는 가공된 젓갈 시료의 원료의 판별 가능하며, 이러한 결과는 식품안전관리에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Seong Seok Choi https://orcid.org/0000-0003-1243-0879
Yong Bae Seo https://orcid.org/0000-0002-1526-9403
Jong-Oh Kim https://orcid.org/0000-0002-1764-1045
Ji-Young Yang https://orcid.org/0000-0002-4598-6542
Jiyoung Shin https://orcid.org/0000-0002-1775-1818
Gun-Do Kim https://orcid.org/0000-0001-5965-0495

References

1. Lee, W.D., Chang, D.S., Kang, S.M., Yoon, J.H., Lee, M.S., Development of new manufacturing process for Changran-jeotgal. *Korean J. Fish. Aquat. Sci*., **34**, 109-113 (2001).
2. Kang, S.K., Park, J.H., Kim, S.A., Size-class estimation of the number of walleye pollock *Theragra chalcogramma* caught in the Southwestern East Sea during the 1970s-1990s. *Korean J. Fish. Aquat. Sci*., **46**, 445-453 (2013).
3. Lin, X., Kim, K.S., Empirical analysis on the factors affecting the consumption of aquatic products in China using panel data. *J. Fish. Bus. Adm*., **44**, 19-33 (2013).
4. Seo, Y.B., Kang, S.C., Choi, S.S., Lee, J.K., Jeong, T.H., Lim, H.K., Kim, G.D., Phylogenetic study of genus *Haliotis* in Korea by cytochrome c oxidase subunit 1 and RAPD analysis. *J. Life Sci*., **26**, 406-413. (2016).
5. Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol*., **32**, 128-144. (1991).
6. Park, J.K., Shin, K.H., Shin, S.C., Chung, K.Y., Chung, E.R., Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Sci. Anim. Resour*., **27**, 209-215 (2007).
7. Sezaki, K., Itoi, S., Watabe, S., A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. *Fish. Sci*., **71**, 414-421 (2005).
8. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G., Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465 (1981).
9. Tanabe, S., Miyauchi, E., Muneshige, A., Mio, K., Sato, C., Sato, M., PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **71**, 1663-1667 (2007).
10. Birky-Jr, C.W., Fuerst, P., Maruyamat, T., Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, **121**, 613-627 (1989).
11. Espiñeira, M., Vieites, J.M., Santaclara, F.J., Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods. *Food Chem*., **121**, 527-532 (2010).
12. Santaclara F.J., Espiñeira, M., Vieites, J.M., Genetic Identification of Squids (Families Ommastrephidae and Loliginidae) by PCR-RFLP and FINS Methodologies. *J. Agric. Food*

Chem., **55**, 9913-9920 (2007).
13. Chapela, M.J., Sotelo, C.G., Calo-Mata, P., Pérez-Martín, R.I., Rehbein, H., Hold, G.L., Quinteiro, J., Rey-Méndez, M., Rosa, C., Santos, A.T., Identification of cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *J. Food Sci*., **67**, 1672-1676 (2006).
14. Ha, J.C., Jung, W.T., Nam, Y.S., Moon, T.W., PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. *J. Food Prot*., **69**, 2241-2247 (2006).
15. Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Pavón, M.A., Hernández, P.E., González, I., Martín, R., Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.*, **85**, 452-458 (2007).
16. Kim, H.S., Seo, Y.B., Choi, S.S., Kim, J.H., Shin, J.Y., Yang J.Y., Kim, G.D., Development and validation of multiplex polymerase chain reaction to determine squid species based on 16s rRNA gene. *J. Food Hyg. Saf.*, **30**, 43-50 (2015).
17. Chung, I.Y., Seo, Y.B., Yang, J.Y., Kim, G.D., Development and validation of Real-time PCR to determine *Branchiostegus japonicus* and *B. albus* species based on mitochondrial DNA. *J. Life Sci*., **27**, 1331-1339 (2017).
18. Ministry of Food and Drug Safety: Guidelines for determining the authenticity of ingredients used in food (II) Utilization of genetic analysis method, pp. 16-90. (2012).
19. Ministry of Food and Drug Safety: Genetic analysis method to determine the authenticity of raw materials used in food, pp. 103-113 (2016).
20. Aida, A.A., Che Man, Y.B., Wong, C.M.V.L., Raha, A.R., Son, R., Analysis of raw meats and fats of pig using polymerase chain reaction for halal authentication. *Meat Sci*., **69**, 47-52 (2005).
21. Park, Y.C., Jin, S.O., Lim, J.Y., Kim, K.H., Lee, J.H., Cho, T.Y., Lee, H.J., Han, S.B., Lee, S.J., Lee, K.H., Yoon, H.S., Application for identification of food raw materials by PCR using universal primer. *J. Food Hyg. Saf*., **27**, 317-324 (2012).
22. Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., Stewart Jr, C.N., Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, **7**, 85 (2006).
23. Kim, K,H, Kim, M.R., Park, Y.E., Kim, Y.S., Lee, H.Y., Park, Y.C., Kim, S.Y., Choi, J.D., Jang, Y.M., Detection and differentiation of intentional and unintentional mixture in raw meats using real-time PCR. *J. Food Hyg. Saf.,* **29**, 340-346 (2014).