pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 29, No. 2, pp. 158~163 (2014)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.2.158

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

국내 유통 식육 및 식육가공품에서 축종감별을 위한 PCR 및 ELISA 검사법 검증

허은정 · 고은경[1] · 서건호[2] · 김영조 · 박현정 · 위성환[1] · 문진산[1]*
식품의약품안전처, [1]농림축산검역본부, [2]건국대학교 수의과대학

Validation of PCR and ELISA Test Kits for Identification of Domestic Animal Species in Raw Meat and Meat Products in Korea

Eun-Jeong Heo, Eun-Kyung Ko[1], Kun-Ho Seo[2], Young-Jo Kim,
Hyun-Jung Park, Sung-Hwan Wee[1], and Jin-San Moon[1]*
Livestock Product Standard Division, Food Microbiology Division and Agro-Livestock & Fishery Products Policy Division, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon 363-951, Korea
[1]Veterinary Pharmaceutical Management Division, Animal and Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea
[2]KU Center for Food Safety, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
(Received April 10, 2014/Revised May 19, 2014/Accepted June 12, 2014)

ABSTRACT - In this study, two commercial PCR and ELISA test kits were examined for identification of eight animal species (beef, pork, chicken, duck, turkey, goat, lamb, and horse) from raw meat and meat products in Korea. The detection limit in RAW meat ELISA kit® on three types of meat samples blended with beef, pork and chicken, demonstrated that all meat species were differentiable down to 0.2%. RAW meat ELISA kit® on animal species resulted in differentiation rate of 94.5% for beef, 93.3% for pork, 90% for lamb, and 100% for chicken, duck, turkey, goat, and horse. In contrast, Powercheck Animal Species ID PCR kit™ resulted in 100% specificity at 0.05% limit of detection for all meat species. The detection limit of Cooked Meat ELISA kit® on mixed meat samples heat-treated with different temperatures and times, resulted in 0.1% for all heat-treated mixed meat except for chicken at 1.0%. Additionally, ELISA kit on sixty meat products resulted in specificity of 31.8% for ham, 13.6% for sausages, and 12.5% for ground processed products, and relatively low rate for more than 2 types of mixed meats. On the contrary, meat species differentiation using PCR kit showed higher percentage than that using ELISA kit®: 50.0% for ham, 41.7% for sausages, and 28.6% for ground processed meat. Futhermore, PCR kit on 54 dried beef meats detected pork genes in 13 products whereas ELISA kit showed negative results for all products. Hence, the possibility of cross-contamination during manufacturing process was investigated, and it was found that identical tumblers, straining trays, cutters and dryers were used in both beef and pork jerky production line, suggesting the inclusion of pork genes in beef products due to cross-contamination. In this study, PCR and ELISA test kits were found to be excellent methods for meat species differentiation in raw meat and heat-processed mixed meat. However, lower differentiation rate demonstrated in case of meat processed products raised the possibility of inclusion of other species due to cross-contamination during manufacturing process.

Key words: raw meat, meat products, differentiation of meat species, ELISA, PCR

최근, 종교적 이유 혹은 일부 특정 육류에 대한 알러지 반응 등 식품안전 확보차원에서 정확한 육제품의 표기는 중요한 사회적 문제로 대두되고 있다. 또한, 값싼 식육 원료를 의도적으로 혼합하거나 표시사항을 허위로 기재한 식육의 제조·유통 사례가 급증함에 따라 가짜식품 (Economically Motivated Adulteration) 방지대책이 필요하게 되었다[3]. 특히, 쇠고기에 값싼 가금류의 고기가 혼입되는 경우가 22.0%로 보고되어 건전한 식육 유통질서 확립이 필요한 실정이다[2]. 이러한 문제해결을 위해서는 신속하고 정확한 식육감별법의 도입이 필요하다[3].

식육감별에 있어서, 전 세계적으로 가장 널리 사용되는 검사법으로는 특정 DNA와 단백질을 이용한 Immuno-based methods, Chromatographic methods, Hybridization methods,

*Correspondence to: Jin-San Moon, Veterinary Pharmaceutical Management Division, Animal and Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea.
Tel: 82-31-467-4303, Fax: 82-31-467-4321
E-mail: moonjs727@korea.kr

End point PCR methods, Real time PCR methods가 있다[3,7]. 12S rRNA, 16S rRNA, 그리고 cytochrome b (cyt b)와 같은 mitochondrial DNA(mt DNA) 유전자에 기반을 둔 PCR 검사법은 신속성, 민감성 및 특이성에서 우수하기 때문에 반추류(소, 면양, 산양, 사슴), 가금류(닭, 칠면조, 오리, 거위), 개, 고양이 그리고 돼지와 같은 축종을 감별하는데 가장 널리 쓰이고 있다[6,9,10,13,16]. 특히, mt DNA 유전자는 핵내 DNA보다 세포 당 수천 개의 copy number가 있어 열변성에 의해 야기된 DNA 단편으로부터 적절한 크기로 증폭될 수 있다. 또한, 다양한 축종에서 보고 된 염기서열의 유용성뿐만 아니라 동물 mt DNA 유전자 구성에 관한 방대한 정보를 이용할 수 있어 PCR 증폭을 위한 축종별 특이 primer를 쉽게 설계할 수 있어 혼합육에서 신뢰성 있는 축종감별이 가능하다는 장점을 지니고 있다[4,11,12]. 또한, 미국 농무성 산하의 식품안전검사청(FSIS)에서는 식육과 열처리육에서 추출한 단백질과 품종 특이 항체와의 결합반응을 이용한 샌드위치 type의 ELISA법이 국가 공인 검사법으로 등재되어 현장에서 신속하게 사용되고 있으며, 소, 돼지, 닭, 칠면조, 양, 말, 사슴의 17종에 대한 특이도는 100%에 이르는 것으로 보고되고 있다[5].

우리나라의 경우 축산물의 가공기준 및 성분규격에 표시된 식육감별법으로는 이화학적 방법, 혈청학적 검사법, 유전자검사법이 있다[17]. Glycogen검사법, 지방검사법 및 자비법은 식육감별기준이 모호하거나 매우 주관적이고, DNA hybridization법과 혈청학적 검사법인 면역혈청침강반응, 미량겔확산법 그리고 한천겔확산법은 근연종에서 교차반응이 발생하며, 히스티딘 디펩타이드법은 두 가지 이상의 혼합육에서는 식육을 감별할 수 없는 단점 있다. 최근에 혈청학적 검사법으로 ELISA법을 도입하였으나 시간과 비용적인 측면에서 좀 더 경제적인 검사법이 필요한 실정이다[14,17]. 특히, 최근 식육가공품의 종류가 다양화되고 세분화 되고 있는 가운데 육가공 제조업체에서 저가의 고기를 고가의 육류로 둔갑시켜 유통시키거나 가공 육제품의 원료로 사용될 경우에 축산식품의 표시사항을 허위로 기재하거나 비의도적으로 잘못 표시하므로 저가의 육류를 부정하게 혼합한 제품 등에 대한 검증과 부정유통을 예방할 수 있는 검사법이 필요하다[14].

국내에서도 최근 식육감별을 위한 PCR 검사법 개발 연구가 진행되고 있다[14,15]. 하지만 이러한 연구들은 식육 또는 일부 축산물가공품에 대하여 전처리 조건 및 적용여부 평가차원에서 제한된 시료를 이용하여 연구적 수준에서 조사되었다. 이에 본 연구에서는 국내에서의 식육감별검사기관의 실험실 여건과 식육 소비 수준을 고려하여 상용화되고 있는 single PCR 및 ELISA kit를 이용하여 소, 돼지, 닭, 오리, 칠면조, 염소, 양, 말 등 8종의 식육을 포함하여 인위적으로 제조한 혼합육, 그리고 식육 혼입 여지가 많은 햄, 소시지, 분쇄육, 식육추출가공품을 대상으로 식육품종 표시제에 대한 모니터링 결과를 분석하여 감별 민감도와 특이도를 평가하고 실용화를 위한 타당성을 밝히고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료

2012년 1월부터 12월까지 1년 동안 소, 돼지, 닭, 오리, 칠면조, 염소, 양, 말 8종의 축종에 대하여 각각 10개 이상의 시료 총 176개를 도축장, 대형마트, 식육판매업체에서 각각 채취하였다. 식육가공품은 포장지에 표시되어있는 원재료 식육 표시사항을 감안하여 국내 제조공장에서 생산되거나 대형마트에서 판매되고 있는 소, 돼지, 닭, 칠면조 고기가 단독 또는 혼합으로 함유된 햄 22개 제품, 소시지 22개 제품, 분쇄육 16개 제품 등 총 60개 제품을 선별하여 시료를 채취, 냉동고에 보관하며 시험에 사용하였다.

혼합육 제조 및 열처리 조건

RAW meat ELISA kit®(BioKits, USA) 및 Powercheck Animal Species ID PCR kit™(Kogene Biotek, Korea)의 축종 특이도와 검출한계를 평가하기 위하여 인위적으로 쇠고기와 돼지고기, 돼지고기와 닭고기, 쇠고기와 닭고기 등 3종으로 각각 혼합하여 쇠고기, 돼지고기, 닭고기를 비율별로 9:1로 혼합하였다. 또한, 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 혼합육에 대하여 식육가공품의 가공조건을 고려하여, 83°C에서 30분, 100°C에서 20분, 121°C에서 10분으로 각각 열처리한 다음 Cooked meat ELISA kit®(BioKits, USA)를 사용하여 축종감별의 특이도와 민감도를 조사하였다.

시료에서 단백질 추출 및 ELISA 검사법

Biokits raw species identification test kit™ 및 Biokits cooked species identification test kit™(BioKits, USA)를 이용하여 제조사의 시험방법에 따라 식육감별을 실시하였다. Biokits cooked species identification test kit의 경우, 깨끗한 용기에 식육시료 25 g을 담은 다음 잘게 세절하여 멸균백에 담고, 0.9% NaCl 용액 또는 증류수를 100 ml 첨가한 뒤 shaker를 이용해 2분간 잘 섞어주었다. 이어서, 실온에서 10-15분간 방치한 다음 다시 2분간 섞어준 뒤, 실온에서 10-15분간 방치하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질 100 µl을 ELISA plate의 test well에 첨가한 후 잘 섞어준 뒤 커버를 덮어 실온에서 45분간 반응시켰다. 반응 후, wash solution으로 각 well을 3번씩 씻어준 다음, species biotin을 모든 well에 50 µl 씩 첨가하고 잘 섞어준 뒤 커버를 덮고 실온에서 45분간 반응시킨다. Working wash solution으로 각 well을 3번씩 씻어준 후 avidin peroxide conjugate를 모든 well에 50 µl 씩 첨가한 다음 15분간 반응시켰다. Wash solution으로 각 well을 5번씩 씻어준 후

TMB substrate를 각 well에 100 µl 씩 첨가한 후 45분간 반응시키고 stop solution을 각 well에 50 µl 씩 첨가한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Biokits raw species identification test kit의 경우, 시료 1 g에 0.9% NaCl 용액 또는 증류수 10 ml를 첨가한 뒤 shaker를 이용해 10분간 잘 섞어준 다음, 키트에서 제공되는 working solution으로 10배 희석하였다. 희석액 100 µl를 각 well에 분주한 후 실온에서 10-20분 정치한 후 wash solution으로 3-5번 세척하였다. Avidin peroxide conjugate를 모든 well에 50 µl 씩 첨가한 다음 20분간 반응시킨 후 다시 5회 세척 후 TMB substrate를 각 well에 100 µl 씩 첨가하였다. 이하 과정은 cooked meat kit의 과정과 동일하게 수행하였다.

시료에서 DNA 분리 및 PCR 검사법

소, 돼지, 닭, 오리 등 8종의 식육 및 식육가공품에 대하여 국내에서 상용화되어 판매되고 있는 식육감별용 single PCR법인 Powercheck Animal Species ID kit™(Kogene Biotek)를 구입하여 Park 등(2012)의 방법에 따라 실험을 실시하였다. 시료를 잘게 분쇄하여 SPK buffer(27% Sucrose, 1 × SSC(20 × SSC : NaCl 175.3 g, Sodium citrate 88.2 g, pH 7.0, 3차 증류수 1 *l*, Autoclave 105°C), 1 mM EDTA, 1% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate) 5 ml을 첨가한 뒤, inverting 한 후 ml 당 RNase(10 mg/ml) 2 µl와 proteinase K(25 mg/ml) 5 µl를 첨가하였다. 55°C로 맞춰진 water bath에 넣고 overnight한 다음 3M NaCl 0.1 ml를 첨가한 뒤 inverting한 후 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 후, 상층액을 새 튜브로 옮기고, 동량의 phenol을 첨가한 뒤 inverting한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브로 옮기고, 동량의 100% ethanol을 첨가한 뒤 inverting한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 침전물을 새 튜브로 옮겨 70% ethanol 1 ml를 첨가한 뒤 inverting하였다. 이어서, 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 pellet 상태의 DNA만 회수한 다음 dry oven에서 건조 후 3차 증류수 또는 TE Buffer(Bioneer, Korea)를 첨가하여 genomic DNA를 분리하였다.

시료에서 채취한 genomic DNA 2 µl(25~50 ng)를 각 축종에 따른 PCR primer mix 4 µl, 5 × Reaction Buffer 4 µl, Taq DNA polymerase 1 µl(1~2 U), 그리고 3차 증류수 9 µl를 첨가하여 반응시켰다. PCR 반응조건으로는 95°C에서 10분간 denaturation을 실시한 후 95°C에서 30초, 59°C에서 10초, 72°C에서 30초를 32 cycle로 한 후 72°C에서 5분간 extension 후 8°C에서 종료하였다. 최종산물의 확인은 반응액 3 µl를 취하여 agarose gel로 100V에서 30분간 전기영동하고 marker로는 100bp DNA ladder를 사용하였다. 전기영동이 끝난 후, EtBr(ethidium bromide)로 염색(1 µg/ml) 한 후 UV 투영기를 이용하여 결과를 확인하였다.

쇠고기 육포에 대한 PCR 및 ELISA 검사 및 현장 조사

건조저장육류인 쇠고기 육포에 돈육을 섞어 제조한다는 정보에 따라 2012년 8월에 시중에 유통되고 있는 54개 제품(국내산, 호주산, 뉴질랜드산 쇠고기를 사용한 제품)에 대하여 일차적으로 PCR법으로 검사를 실시한 후 양성시료에 대하여 Cooked Meat ELISA Kit®로 추가검사를 실시하였다. 또한, PCR 검사에서 양성반응을 보인 제품에 대하여 육포 생산업체를 직접 방문하여 쇠고기 육포 제조과정에서 실제 돈육을 혼합하는지 여부 및 기타 품목제조보고서, 표시기준, 쇠고기 및 돼지고기 원료육 보관창고(냉장, 냉동)물량 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

식육 및 열처리 혼합육에 대한 ELISA 및 PCR Kit의 축종 감별력 및 검출한계

쇠고기와 돼지고기, 돼지고기와 닭고기, 쇠고기와 닭고

Table 1. Detection limit of ELISA kit on the strip of raw beef, pork, and chicken, and cooked mixed meats

Type	Mixing type	Cow strip	Pig strip	Chicken strip
Raw meat	Pig + Chicken	Negative	0.05%	0.05%
	Cow + Pig	0.05%	0.05%	Negative
	Cow + Chicken	0.20%	Negative	0.20%
Cooked meat at 83°C for 30min	Pig + Chicken	Negative	0.05%	0.05%
	Cow + Pig	0.10%	0.10%	Negative
	Cow + Chicken	0.05%	Negative	0.05%
Cooked meat at 100°C for 20min	Pig + Chicken	Negative	0.10%	0.10%
	Cow + Pig	1.0%	1.0%	Negative
	Cow + Chicken	0.05%	Negative	0.05%
Cooked meat at 121°C for 10min	Pig + Chicken	Negative	< 0.05%	0.05%
	Cow + Pig	0.05%	< 0.05%	Negative
	Cow + Chicken	0.05%	Negative	0.05%

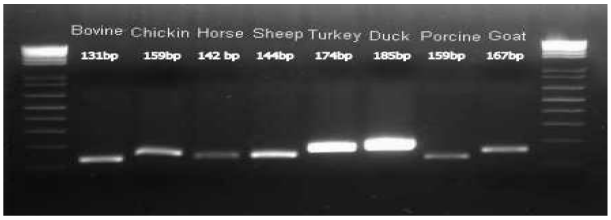

Fig. 1. PCR products of animal species identification for eight raw meats (cow, pig, chicken, duck, turkey, goat, sheep, horse) collected from slaughterhouses, hypermarkets and local butcher shops in Korea.

기에 대하여 비율별(90%, 50%, 10%, 5%, 1%, 0.2%, 0.1%, 0.05%)로 혼합육을 만들어 RAW meat ELISA kit®을 이용하여 축종감별력과 검출 한계를 조사하였다. 소와 돼지는 소와 돼지 strip에, 닭, 오리, 칠면조는 가금 strip에서 반응이 나타날 경우에 양성으로 판정하였다. 시험결과, 소, 돼지, 그리고 닭고기 모든 축종의 식육에서 100%의 민감도를 나타내었으며, 소와 닭고기 혼합육의 경우에는 0.2%까지, 소와 돼지 및 돼지와 닭고기 혼합육 및 닭 strip에서 0.05%까지 감별이 가능하였다(Table 1). 또한, 소, 돼지, 닭고기 혼합육에 대하여 식육가공품의 가공조건을 감안하여 83°C 30분, 100°C 20분, 121°C 10분에서 열처리한 다음 Cooked meat ELISA kit®를 이용하여 축종 특이도와 민감도를 조사하였다. 그 결과, 83°C 열처리 조건에서는 돼지와 쇠고기 혼합육의 경우에 돼지감별용 strip에서 0.1% 농도까지 감별하였고, 나머지 혼합육 모두에서는 0.05% 까지 감별되는 것으로 나타났다. 100°C 열처리 조건에서는 돼지와 닭고기 strip에서 0.1%까지 감별이 가능하였고, 소 strip에서 소와 돼지고기 혼합육은 1%까지 감별이 가능하였으며 다른 혼합육의 모든 시료에서는 0.05%까지 감별이 가능하였다. 121°C 열처리의 조건에서는 모든 시료에서 0.05% 농도까지 감별이 가능하여 가장 높은 민감도를 나타내었다. PCR kit의 경우에는 소, 돼지, 닭고기 모두 0.05% 농도에서 양성 반응을 나타내었다. 돼지, 닭, 오리, 칠면조, 양, 말, 염소 8종의 식육에 대하여 각 시료 10개씩 PCR법을 적용한 결과, Fig. 1에서와 같이, 소, 닭, 말, 양, 칠면조, 오리, 돼지, 산양의 모든 식육 시료에서 각각 131, 159, 142, 144, 174, 185, 159, 167bp의 PCR 산물이 확인되었으며, 8종의 모든 시료에서 100%의 축종 감별력을 보였다. 또한, 동일한 시료를 포함하여 식육의 대표적인 축종인 소, 돼지, 닭고기, 오리고기를 포함하여 칠면조, 양, 말, 염소 등 총 8종의 식육 176건을 대상으로 RAW meat ELISA kit®을 이용하여 축종 감별력을 조사하였다. 소, 돼지, 닭고기는 소, 돼지, 닭고기 strip에 각각 적용하였으며, 오리, 칠면조는 가금 strip에서, 염소는 양의 strip에서 반응이 나타날시 양성으로 판정하였고, 말은 모든 stip에서 반응이 없을 시 양성으로 판정하였다. 그 결과, 쇠고기에서는 94.5%, 돼지고기에서는 93.3%, 양고기에서는 90.0%, 오리, 염소, 말, 칠면조 등의 고기에서는 100%의 축종 감별력을 나타내어 식육감별력이 매우 우수한 것으로 나타났다(Table 2).

식육가공품에 대한 PCR 및 ELISA Kit의 축종 감별력

가공식품의 경우 고압, 살균과 같은 가공처리 과정을 거치면서 단백질 변성 및 수용성 단백질 프로파일의 변화가 일어나기 때문에 최근 단백질보다 상대적으로 안정성이 유지되는 DNA 분석을 할 수 있는 PCR법을 이용하여 신속·정확하게 원료성분을 분석하는 추세이다[1]. 또한, 제조공정 중 가열, 압력 등에 의하여 세포에 존재하는 유전자가 손상된 경우에는, PCR법의 적용을 위해 가능한 한 PCR 산물의 크기를 200bp 이내로 프라이머를 설계해야 한다[15].

본 조사에서도 PCR 산물이 200bp 이내인 프라이머를 이용하여 햄 10개, 소시지 12개, 분쇄가공육 14개 제품을 포함하여 총 36개 시료에 대하여 PCR 검사법을 적용하였다. 그 결과 소, 돼지, 닭 등의 고기가 함유된 제품에 대하여 각각 131, 159, 159bp의 PCR 산물이 생성되었지만, 일부 시료에서는 교차반응에 의한 비특이 밴드가 확인되었고 총 36개 시료 중 원재료 표시사항에 맞게 감별된 시료는 36개 시료 중 14개 시료(38.9%)로 조사되어 축종 감별력이 매우 낮게 나타났다. 각 식육가공품에 대한 감별력은 햄이 50%로 가장 높았으며, 소시지(41.7%), 분쇄가공육(28.6%) 순으로 나타났다(Table 3).

또한, Cooked Meat ELISA kit®로 국내 유통 중인 햄,

Table 2. Comparison on the sensitivity of ELISA and PCR kit for the identification of animal species in raw meats

Species	ELISA kit		PCR kit	
	No of positive / Samples tested	Sensitivity (%)	No of positive / Samples tested	Sensitivity (%)
Cow	52/55	94.5	10/10	100
Pig	28/30	93.3	10/10	100
Chicken	30/30	100	10/10	100
Duck	21/21	100	10/10	100
Goat	10/10	100	10/10	100
Turkey	10/10	100	10/10	100
Sheep	9/10	90.0	10/10	100
Horse	10/10	100	10/10	100

Table 3. Comparison on the sensitivity of ELISA and PCR kit for the identification of animal species in processed meat products

Item	Species	No. of positive / Samples tested (%)	
		ELISA kit	PCR kit
Ham	Pig	4/12 (33.3)	3/ 4 (75.0)
	Chicken	1/ 3 (33.3)	0/ 3 (0)
	Pig + Chicken	1/ 6 (16.7)	1/ 2 (50.0)
	Turkey	1/ 1 (100)	1/ 1 (100)
subtotal		7/22 (31.8)	5/10 (50.0)
Sausage	Pig	3/11 (27.3)	0/ 4 (0)
	Pig + Chicken	0/11 (0)	5/ 8 (62.5)
subtotal		3/22 (13.6)	5/12 (41.7)
Ground meat	Pig	0/ 5 (0)	1/ 2 (50.0)
	Chicken	1/ 1 (100)	1/ 2 (50.0)
	Cow	1/ 2 (50)	0/ 1 (0)
	Pig + Chiken	0/ 6 (0)	1/ 6 (20.0)
	Pig + Cow	0/ 1 (0)	1/ 2 (50.0)
	Pig + Chicken + Cow	0/ 1 (0)	0/ 1 (0)
subtotal		2/16 (12.5)	4/14 (28.6)
	Total	12/60 (20.0)	14/36 (38.9)

소시지, 분쇄가공육 등 식육가공품 60개 시료에 대하여 식육감별검사를 실시한 결과, 제품의 표시사항과 일치한 시료는 12개(20.0%)로 식육에 비하여 민감도가 매우 낮았다. 식육 감별력은 햄(31.8%), 소시지(13.6%), 분쇄육(12.5%) 순으로 나타났으며, 혼합육의 민감도가 더욱 낮은 것으로 나타났다. 전체적으로 식육가공품에 대한 PCR 및 ELISA 검사법의 낮은 식육감별력은 식육가공품의 가공과정 중 주형유전자의 파괴 또는 가공과정에서 첨가된 식품에 존재하는 저해물질의 존재로 기인된 것이라 사료된다. 또한, 국내 식육가공업체들은 식육별로 공정라인이 따로 분리되어 있지 않기 때문에 라인에 남아있는 소, 돼지, 닭 등의 다른 축종의 식육 혼입이나 제조과정중 기계·기구류의 공동사용으로 인한 식육간 교차오염에 의한 것으로 사료된다[8,15-16].

쇠고기 육포에 대한 실험실 및 현장조사에 의한 식육감별

국내에서 유통되고 있는 쇠고기 육포 54개 제품에 대하여 PCR 검사를 실시한 결과, 16개 제품에서 쇠고기 유전자 이외에 돈육 유전자가 추가로 검출되었다(Table 4). 이에 돈육 유전자가 검출된 시료에 대하여 ELISA 검사를 실시한 결과, 모든 시료에서 음성을 나타내었다. 제조공정에서의 돈육 혼입 여부를 조사하기 위하여 육포 제조업체를 대상으로 현장조사를 실시하였다. 조사된 식육가공업체들의 대부분이 식육별로 공정라인이 따로 분리되어 있지 않고, 쇠고기 육포와 돼지고기 육포가 동일 제조시설에서 만들어지고 있었으며, 쇠고기 육포 생산라인의 텀블러, 채반, 절단기, 건조기 등의 기계·기구류가 돼지고기 육포에 동시에 사용되고 있었으며, 건조시, 홍두깨살과 우둔을 고리에 걸어 건조시키는 것으로 확인되었다. 이는 공정라인에 남아있는 다른 축종의 식육 DNA의 혼입이나 제조과정에 사용되는 기계·기구류의 공동 사용에 의한 교차오염에 의하여 쇠고기 육포에 돈육이 비의도적으로 혼입된 것으로 확인되었다. 따라서 축산식품의 표시사항 위반에 대한 점검을 실시할 경우에는 실험실 검사와 더불어 현장 조사를 실시하여 다른 축종의 식육 DNA가 교차오염에 의한 것인지를 종합적으로 판단해야 할 것이며, 제조업체에서는 기계·기구류 등의 세척관리, 가공공정 개선으로 교차오염이 발생하지 않도록 예방대책이 수립되어져야 할 것으로 사료된다.

Table 4. Comparison on positive rate for labelling of ELISA and PCR kit for the identification meat species of dried beef meats

Classification	No. of positive result			
	ELISA kit		PCR kit	
	Beef strip	Pork strip	Cow primer	Pig primer
No. of samples tested (n = 16)	16	0	16	16
False positive ratio for labelling	0%	0%	0%	100%

한편, 본 조사에서 16개의 쇠고기 육포 중 모든 제품에서 PCR 검사법에서는 소와 돼지 유전자가 동시에 검출되었으나, ELISA 검사법에서는 소에 대해서만 양성반응을 나타내고 돼지에서는 음성 반응을 나타내었다. 따라서 DNA를 검출하는 PCR 검사법은 항원-항체 반응에 기초한 ELISA 검사법보다 민감도가 높아 생산·제조 시 교차오염으로 인한 DNA 혼입 시에도 증폭되기 때문에 양성으로 판정된 것으로 사료된다[3].

본 연구 결과, 국내에서 상용화되고 있는 PCR 및 ELISA 검사법의 경우에 소, 돼지, 닭, 오리 등의 식육 및 열처리 혼합육에 대하여 축종별 감별력이 우수한 것으로 조사되었다. 하지만 식육가공품에 있어서는 감별력이 낮은 것으로 조사되었는데, 이는 제조과정에서 식육간 교차오염에 의한 것으로, 식육가공업체의 식육 혼입에 의한 교차오염 방지를 위한 대책수립이 필요한 것으로 사료된다. 또한, 국가적으로 식육 또는 식육가공품에 포함되어 있는 식육에 대하여 축종별 감별로 제품의 원재료 표시제의 조기 정착 및 관리대책 마련을 위해서는 향후에도 지속적으로 국내에서 유통되고 있는 다양한 식육가공품에 대하여 식육감별법에 대한 재평가와 더불어 식육가공업체에 대한 제조관리 실태에 대한 지속적인 조사와 연구가 있어야 할 것이다.

요 약

본 연구에서는 상용화 되고 있는 PCR 및 ELISA kit를 사용하여 국내에서 유통되고 있는 소, 돼지, 닭, 오리, 칠면조, 염소, 양, 말 등 8종의 식육, 혼합육, 그리고 식육가공품에 대하여 축종 감별능력을 평가하였다. 신선육에 대한 RAW meat ELISA kit®의 검출한계는 축종별 함유율 0.20%~0.05% 이었고, 열처리 혼합육에서는 열처리 온도 및 시간, 그리고 축종별로 검출한계는 함유율 1.0%~0.05% 이하까지 다양한 차이를 나타내었다. 8종의 식육에 대한 축종별 감별력은 소 94.5%, 돼지 93.3%, 양 90.0%, 오리, 염소, 말, 칠면조 모두에서 100%를 나타내었다. Powercheck Animal Species ID PCR kit™의 경우에는 함유율 0.05%의 검출한계를 나타내었고 8종의 모든 축종에서 100%의 특이도를 나타내어 축종별 감별력이 우수한 것으로 나타났다. 또한, 햄, 소시지, 분쇄가공품, 식육추출가공품 등 총 60개 식육가공품에 대한 Cooked meat ELISA kit®의 감별력은 햄(35.3%), 소시지(13.6%), 분쇄가공육(12.5%)의 순으로 나타났으며, 2종 이상의 혼합육에서는 상대적으로 낮은 감별력을 보여 제조과정에서 식육간 교차오염에 의한 혼입가능성이 있는 것으로 확인되었다. 쇠고기 육포 54개 제품에 대하여 다른 고기 혼입여부를 PCR Kit로 검사한 결과 13개 제품에서 돼지고기 유전자가 검출되었지만 ELISA Kit에서는 모두 음성으로 나타났다. PCR 양성 시료의 제조공정 중 교차오염 여부를 조사한 결과, 텀블러, 채반, 절단기, 건조기가 쇠고기 및 돼지고기 육포 생산라인에 동일하게 사용되어 교차오염에 의한 혼입으로 추정되었다. 종교적 이유 및 일부 특정 육류에 대한 알러지 반응 등 식품안전 확보차원에서 제품의 원재료의 올바른 표시와 식육간 교차오염이 발생되지 않도록 철저한 품질관리가 되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 농림축산검역본부의 연구개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Aida, A.A., Che Man, Y.B., Wong, C.M.V.L., Raha, A.R. and Son, R.: Analysis of raw meats and fats of pig using polymerase chain reaction for halal authentication. *Meat Sci.,* **79**, 47-52 (2005).
2. Ayaz, Y., Ayaz, N. D. and Erol, I.: Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *J Muscle Foods*, **17**, 214-220 (2006).
3. 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).
4. Bottero M.T. and Dalmasso, A.: Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet. J.,* **190**, 34-38 (2011).
5. FSIS : Laboratory guidebook. Identification of animal species in meat and poultry products. Available from: http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/Mlg17.02.pdf. (2005).
6. Ha, J.C., Jung, W.T., Nam, Y.S. and Moon, T.W.: PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. *J. Food Prot.,* **69**, 2241-2247 (2006).
7. Kaupe, B., Winter, A., Fries, R., & Erhardt, G.: DGAT1 polymorphism in Bos indicus and Bos taurus cattle breeds. *The Journal of Dairy Research,* **71**, 182-187 (2004).
8. Lee, S.Y., Jang, K.I., Woo, G.J., Kwak, H.S. and Kim, K.Y.: Development of Protocol for the Effective Detection of Feline Calicivirus as Norovirus Surrogate in Oyster and Lettuce, Korean *J. Food Sci. Techinol.,* **39**, 71-76 (2007).
9. Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Pavón, M.A., Hernández, P.E., González, I. and Martín, R.: Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.,* **85**, 452-458 (2007a).
10. Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernández, P.E., González, I. and Martín, R.: Technical note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.,* **85**, 2734-2739 (2007b).
11. 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).
12. Paul, D.N., Hebert, A.C., Shelley, L.B. and Jeremy, Rd.: Biological identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **270**, 313-321 (2003).
13. Tanabe, S., Miyauchi, E., Muneshige, A., Mio, K., Sato, C. and 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).
14. 고바라다, 김지연, 나호명, 박성도, 김용환: 식육감별을 위한 미토콘드리아 12S rRNA와 16S rRNA 유전자의 종 특이적 multiplex PCR 기법 개발. 한국가축위생학회지, **34**, 417-428 (2011).
15. 박용춘, 진상욱, 임지영, 김규헌, 이재황, 조태용, 이화정, 한상배, 이상재, 이광호, 윤혜성: 일반 프라이머를 이용한 PCR의 식품원료 진위 판별에 적용. *J. Fd Hyg. Safety* **27**, 317-324 (2012).
16. 박종근, 신기현, 신성철, 정구용, 정의룡: 미토콘드리아 12S rRNA 유전자의 종 특이적 PCR-RFLP fingerprint를 이용한 식육 원료의 판별. 한국축산식품학회지, **27**, 209-215. (2007)
17. 식품의약품안전처 : 식육감별법, In; 축산물의 가공기준 및 성분규격, p. 287-296. (2014).