

## 식물성 식품원료의 진위 판별을 위한 종 특이 프라이머의 개발

김규현\* · 김용상 · 김미라 · 이호연 · 정유경 · 이재황 · 장혜숙 · 박용춘<sup>1</sup> · 김상엽<sup>2</sup> · 최장덕 · 장영미

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 신중유해물질팀,  
<sup>1</sup>식품의약품안전처 신소재식품과, <sup>2</sup>부산지방식품의약품안전청 유해물질분석팀

### Development of Species-Specific Primer to Determine the Authenticity of Vegetable Raw Materials in Food

Kyu-Heon Kim\*, Yong-Sang Kim, Mi-Ra Kim, Ho-Yeon Lee, Yoo Kyung Jung, Jae-Hwang Lee, Hye-Sook Chang, Yong-Chjun Park<sup>1</sup>, Sang Yub Kim<sup>2</sup>, 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,

<sup>1</sup>Novel Food Division, Ministry of Food and Drug Safety,

<sup>2</sup>Hazardous Substances Analysis Team, Busan Regional Food and Drug Administration

#### Abstract

In this study, a detection method was developed and optimized using a molecular biological technique to distinguish 21 vegetable food raw materials. The genes for the distinction of species in the raw materials were targeted at Internal Transcribed Spacer (*ITS*) in nucleus and the Maturase K (*matK*) gene in chloroplasts. The species-specific primers were designed for PCR products around 200 bp for their application to processed products. The amplicon size for the following: Winter mushrooms, Shiitakes, Button mushrooms, Lacquer tops, King oyster mushrooms, Oyster mushrooms, Chestnuts, Pine nuts, Walnuts, Aloe, Water dropwort, Scallions, Chinese chives, Cucumbers, Horseradish, Mustard, Mung beans, Red beans, Guarana, Korean dandelions, and Dandelions were confirmed at 166 bp ~ 245 bp, respectively. Non-specific PCR products were not detected in similar species by the species-specific primers. The detection method of raw materials developed in this study would be applied to food safety management for the eradication of adulterated food distribution and protection of consumers' rights.

**Key words:** Vegetable food raw material, PCR, Species-specific primer, Internal Transcribed Spacer, *matK* gene

## 서 론

일반적으로 가짜식품(Economically Motivated Adulteration, EMA)이란 경제적 이득을 취하기 위하여 원재료를 속이고, 의도적으로 저렴한 원료를 사용하는 등 부당한 방법으로 제조된 식품을 의미한다. 최근 식품 원자재 값의 상승 및 경제성장과 산업화에 따른 식생활의 변화에 따라 가짜식품의 제조 및 유통이 크게 증가하여 소비자의 먹거리 불안감을 점점 높아지고 있다. 가짜식품은 농어민과 정상적인 식품 제조회사의 소득증대를 저하시키고 국민의 건강을 위협할 뿐만 아니라 유통질서를 파괴시키는 주범으로

유럽에서는 European Union Regulation(EUR)을 규정하여 가짜식품으로부터 소비자를 보호하기 위한 식품안전과 이력추적제를 추진하고 있고, 미국의 식품의약품청(FDA)과 영국식품기준청(FSA) 등에서도 늘어나고 있는 가짜식품에 대한 관리를 강화하고 있다. 이들과 마찬가지로 국가적인 차원에서 가짜식품의 유통을 근절시킬 수 있는 관리 감독 및 유통 체계를 마련하여야 하고 가공식품의 경우 사용원료의 부정확한 표시나 제조 과정 중 원재료 외 다른 원료들의 비의도적 혼입을 통제하기 위해서는 제품에 함유된 원료 물질을 모니터링 할 수 있는 효율적이고 정확한 분석 방법의 개발이 필요하다.

특히 이중 혼합식품이나 가짜식품 등을 가공하거나 처리하였을 경우 외관이나 관능적 방법에 의한 원재료의 판별이 거의 불가능하기 때문에 원재료의 정확한 표시 및 소비자들의 신뢰성과 안전성 확보를 위하여 원재료 표시에 대해 객관적으로 검증할 수 있는 과학적인 판별 기술 개발이 매우 중요하다. 현재 원재료 검증방법으로 광합성 중 대사 경로에 따른 탄소 동위원소 비율을 분석하는 방법과 분자

\*Corresponding author: 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

Received July 10, 2014; revised September 29, 2014; accepted October 22, 2014

량이 작은 ion-fragment의 패턴 차이를 이용하여 비교분석하는 MS-전자코 분석법(Padovan et al., 2003; Hong et al., 2011a,b), 그리고 원재료가 함유하고 있는 특정 성분 물질의 유무 및 함유량을 확인할 수 있는 크로마토그래피(LC, GC, HPLC) 등을 포함하는 이화학적 분석법이 있고(Schellenberg et al., 2010), 면역효소측정법과 등전점 전기영동법으로 대표되는 단백질 분석법 그리고 분자생물학적 분석기술의 발달에 따라 DNA 분자 수준에서 염기서열 차이에 기초한 PCR기법 등과 같은 유전자 분석법이 있다(Folmer et al., 1994; Fabric et al., 2005). 하지만 이화학적 분석법은 그 방법이 복잡하고 분석 기기가 고가이기 때문에 쉽게 적용할 수 없고, 단백질 분석법은 동일 종 내에서 단백질 발현이 유사하기 때문에 동종간 판별의 이용은 사실상 불가능할 뿐 아니라 열처리 과정을 거친 가공품인 경우 수용성 단백질 및 특이적 항원의 변성으로 감수성이 현저히 떨어지는 문제점이 있다. 최근에는 단백질에 비해 분석 방법이 간단하고 열에 비교적 안정한 유전자를 대상으로 유전자 분석법을 사용하고 있다. 그 중 PCR을 이용한 DNA 검출 방법은 민감성, 특이성이 매우 높을 뿐만 아니라 식품가공이나 제조 과정 중에서도 단백질에 비해 비교적 안정한 물질이므로 외부적 환경 요인에 큰 영향을 받지 않기 때문에 분석결과와의 오차를 줄일 수 있다는 장점을 가지고 있다(Hebert et al., 2003; Monaghan et al., 2003).

분자생물학 및 유전자 분석 기술의 발달로 종 특이적인 DNA 염기서열 차이에 따른 종 판별은 물론 동속 내에서의 종 판별이 가능한 종 특이적 PCR 법이 이용되고 있다. 종의 특이적인 DNA를 증폭하기 위해서는 최적의 유전자 마커 선택(탐색)이 매우 중요하며, 최근에는 종 동정에 DNA barcoding marker를 활용하는 방법이 많이 연구되고 있다. DNA barcode라는 용어는 2003년 Hebert가 최초로 사용한 용어로 종 동정을 위한 최소한의 유전자를 의미하며(Harmer et al., 1989), 이러한 DNA barcode 부위를 증폭하기 위하여 일반적으로 보존력이 좋은 유전자를 선택하고(White et al., 1990; Chase et al., 2007; Chen & Song, 2010), 이 유전자 부위를 증폭할 수 있는 일반프라이머(universal primer)를 개발한다. 식물성은 모계 유전으로 인해 유전적으로 비교적 안정적이고 유전자가 잘 보존되어 있는 엽록체에 존재하는 유전자 부위를 주로 이용한다. 그 중 Rubisco large subunit (*rbclL*) 및 Maturase K (*matK*) 등의 영역은 다른 영역에 비해 빠른 진화 속도를 보여 분자계통분류학적으로 식물 종간 분류 및 종내 분류에 이용되고 있다(Herbert et al., 2003). 또한 핵에 존재하는 Intergenic spacer (*IGS*) 및 Internal transcribed spacer (*ITS*) 영역은 다른 영역에 비해 빠른 진화 속도를 보여 종간, 종내 및 집단 내에서 변이조사 등 DNA barcoding marker로서 광범위하게 이용되고 있다(Kress et al., 2005; Kress & Erickson, 2007; Kress & Erickson, 2008; Lahaye et al.,

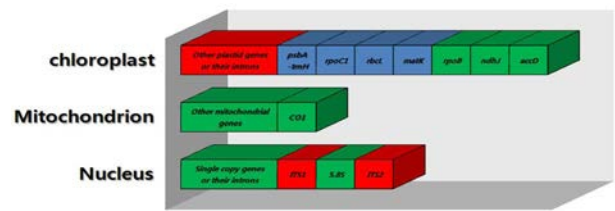


Fig. 1. Genes from three genomes in plants that are candidate barcodes. (Blue markers are potential barcodes, green markers are poor candidates and red markers are pending to be investigated.)

2008)(Fig. 1).

식품원료의 종 판별을 위한 DNA barcoding marker 유전자 증폭에는 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 첫 번째, 일반 프라이머(universal primer)를 이용하여 증폭 후 염기서열을 결정하고 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi))에 등록되어 있는 염기서열과 비교하여 종을 판별하는 방법(Kocher et al., 1989), 두 번째, 종 특이 프라이머(species-specific primer)를 개발하여 유전자 증폭 유무로 종을 판별하는 방법이 있다(Tomoaki et al., 2009). 특히, 가공식품은 제조 가공과정에서 고압살균, 화학처리 및 발효작용 등을 거쳐야 하기 때문에 식품 속의 DNA가 손상될 우려가 있는데 이를 효율적으로 분석할 수 있는 기술 확보가 매우 중요하다. 일반 프라이머를 이용한 염기서열 분석은 PCR 증폭 산물의 크기가 700 bp 이상이므로 가공식품에 적용하기가 어렵지만, PCR 증폭 산물의 크기를 200 bp 내외가 되도록 설계하고 이를 이용하여 증폭 여부로 종을 확인하는 방법이 활용된다(Park et al., 2012a to 2012e; Park et al., 2013).

식품의약품안전처는 2010년부터 2012년까지 불량식품 근절을 위해 유전자 분석법을 이용하여 식품 중 동물성(축산물 12종, 수산물 29종) 및 식물성(33종) 사용원료 74종에 대한 진위 판별법을 개발하여 지방식품의약품안전청, 보건환경연구원, 시·도 지자체, 식품위생검사기관 및 산업계 등에 보급하여 활용하고 있다. 본 연구에서는 2013년도에 버섯류를 포함한 21종의 식물성 식품원료에 대한 진위 판별을 위하여 종 특이 프라이머를 설계하고, PCR 조건을 최적화하여 식품원료에 직접 적용 및 유효성을 확인하였으며, 향후 식물성 식품원료를 포함한 가공식품에 대하여 진위를 판별하는데 과학적인 근거를 제시하고자 하며, 불량식품 근절에 적극 활용될 것으로 기대된다.

## 재료 및 방법

### 시료 선정

국내·외에서 기사화 된 불량식품의 유통 사례와 다소비 식품에 대한 정보를 토대로 대상종을 선정하였다. 대상종

은 총 21 종으로 버섯류 6 종[팽이버섯(*Flammulina velutipes*), 표고버섯(*Lentinula edodes*), 양송이버섯(*Agaricus bisporus*), 영지버섯(*Pleurotus eryngii*), 새송이버섯(*Pleurotus ostreatus*) 및 느타리버섯(*Ganoderma lucidum*)], 견과류 3 종[밤(*Castanea crenata* Sieb), 잣(*Pinus koraiensis*) 및 호두(*Juglans regia*)], 과실류 1 종[대추(*Ziziphus jujuba*)], 채소류 6 종[알로에(*Aloe vera*), 미나리(*Oenanthe javanica*), 부추(*Allium tuberosum*), 오이(*Cucumis sativus*), 고추냉이(*Eutrema wasabi*) 및 겨자(*Brassica juncea*)], 콩류 2 종[녹두(*Vigna radiatus*), 팥(*Vigna angularis*)] 및 기타 3 종[과라나(*Paullinia pachycarpa*), 흰민들레(*Taraxacum coreanum*) 및 민들레(*Taraxacum platycarpum*)]을 포함한다. 선정된 식품원료와 유전적으로 근연종이거나, 식감 및 색이 유사하여 상호간에 육안으로 구분이 어려운 식품군을 비교종으로 선정하였다.

시약 및 시료 구입

PCR을 위한 프라이머는 바이오니아(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 합성하였으며, 유전자 증폭을 위해 *Taq* DNA polymerase 및 dNTPs, MgCl<sub>2</sub>은 TAKARA (TaKaRa Co., JAPAN)에서 구매하였고, PCR 장비는 C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 시료는 청주 인근 대형마트 및 재래시장에서 구입하여 사용하였다.

유전자 추출

식물성 식품원료에서의 유전자 추출은 DNeasy Plant mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하였고, 추출 방법은 제조사에서 제공하는 방법에 의거하여 추출하였으며, 최종 용출단계에서는 멸균증류수를 사용하였다.

종 특이 프라이머 설계

종 특이 프라이머 설계를 위해 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행에 등록되어 있는 식물성 원료에 대한 유전 정보를 확인하였고, 엽록체에 존재하는 *matK*와 핵에 존재하는 *ITS* 유전자 부위에 대한 염기서열을 대상으로 시료 간 비교·분석을 통해 종 특이 프라이머를 설계하였으며, 비교·분석에는 BioEdit ver. 7.0.9.0 프로그램을 사용하였다.

PCR 반응 및 결과 확인

PCR을 위한 반응액의 조성은 추출한 주형 DNA 50~100 ng/μl, dNTPs 200 μM, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM 그리고 10 pM의 정방향 및 역방향 프라이머 각각 1 μl를 혼합하였으며, 최종 용량은 20 μl가 되도록 증류수를 첨가하였다. 본 연구에서 개발된 종 특이 프라이머의 염기서열 및 검출을 위한 최적의 PCR 반응조건은 Table 1에 나타내었다. 최종 산물의 확인은 반응액 5 μl를 취하여 EtBr이 첨가된 (1 μl/ml) 아가로즈 젤로 100V, 30분간 전기영동하였다. PCR 산물의 크기 확인은 100 bp DNA ladder(Bioneer,

Table 1. Information and PCR conditions of species-specific primers used in this study.

Species	Primer	Primer Sequence (5'→3')	Length (bp)	PCR condition				Target region
				Step	Temp.	Time	Cycle	
<i>Flammulina velutipes</i>	SFI13-Enokitake-F	ATGTAACGAATGTCATTGATTA	210	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s	35	
	Annealing	55°C		30 s				
	Extention	72°C		1 m				
	SFI13-Mushroom-R	TGACTCAAACAGGCATGC		Elongation	72°C	7 m	1	
Ist denaturation			94°C	5 m	1			
<i>Lentinula edodes</i>	SFI13-Shiitake-F	ATAGAATGWTCTKGTATTGGG	210	Denaturation	94°C	30 s	35	<i>ITS</i>
				Annealing	55°C	30 s		
	Extention	72°C		1 m				
	SFI13-Mushroom-R	TGACTCAAACAGGCATGC		Elongation	72°C	7 m	1	
				Ist denaturation	94°C	5 m	1	
<i>Agaricus bisporus</i>	SFI13-Agaricus-F	CATGGGCTATGCCTATGAAA	190	Denaturation	94°C	30 s	35	<i>ITS</i>
				Annealing	55°C	30 s		
	Extention	72°C		1 m				
	SFI13-Mushroom-R	TGACTCAAACAGGCATGC		Elongation	72°C	7 m	1	
				Ist denaturation	94°C	5 m	1	
<i>Ganoderma lucidum</i>	SFI13-Ganoderma-F	TTGCGATGTAACACATCTATAT	188	Denaturation	94°C	30 s	35	<i>ITS</i>
				Annealing	55°C	30 s		
	Extention	72°C		1 m				
	SFI13-Mushroom-R	TGACTCAAACAGGCATGC		Elongation	72°C	7 m	1	
				Ist denaturation	94°C	5 m	1	

**Table 1. Information and PCR conditions of species-specific primers used in this study (continued).**

<i>Pleurotus eryngii</i>	SFI13-King oyster-F	CTCAAACACTACTCTGGTTTTTCC	197	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	20 s		
				Annealing	65°C	10 s	35	
				Extention	72°C	30 s		
	SFI13-King oyster-R	GGTTAGAGAGCCAGACTCTATTC		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	SFI13-oyster-F	CTCAAACACTACTTTGGTTTCTTT	206	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
				Annealing	62°C	30 s	35	
				Extention	72°C	1 m		
	SFI13-oyster-R	TTGCCGACGATTRGAGAGCTG		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Castanea crenata</i>	SFI13-Chestnut-F	TAGAACATTTTGCCGAAGTC	181	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>matK</i>
				Denaturation	94°C	20 s		
				Annealing	65°C	10 s	35	
				Extention	72°C	30 s		
	SFI13-Chestnut-R	CATTSCCATAAATTGACAAGG		Elongation	72°C	72°C	1	
<i>Pinus koraiensis</i>	SFI13-Pine nut-F	TTCTCGTCGAAATTCCTGA	211	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>matK</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
				Annealing	60°C	30 s	35	
				Extention	72°C	1 m		
	SFI13-Pine nut-R	GGATAATTGATGAGAACAGAC		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Juglans regi</i>	SFI13-Juglans-F	CTTTTGAGCGAATTA	245	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>matK</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
				Annealing	55°C	30 s	35	
				Extention	72°C	1 m		
	SFI13-Juglans-R	TATATCTAAGAAGGGTT		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Aloe vera</i>	SFI13-Aloe-F	AAGGACGACCGGAACCATT	175	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
				Annealing	62°C	10 s	35	
				Extention	72°C	45 s		
	SFI13-Aloe-R	CCTCCGACCGWTGTGTTCTT		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Oenanthe javanica</i>	SFI13-Water parsley-F	ACGACCCGCTAACGTGTAAC	193	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
				Annealing	62°C	30 s	35	
				Extention	72°C	1 m		
	SFI13-Water parsley-R	TACAYGAAGCGCGYGCATT		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Allium tuberosum</i>	SFI13-Chives-F	TATTGTTTAGAAGGGTTTCC	235	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
				Annealing	58°C	30 s	35	
				Extention	72°C	1 m		
	SFI13-Chives-R	AAGTGTCGCATTTTCGCTA		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Cucumis sativus</i>	SFI13-Cucumber-F	TCGTACCGGCCCTCGGTGGTGC	178	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	15 s		
				Annealing	60°C	5 s	35	
				Extention	72°C	30 s		
	SFI13-Cucumber-R	TTCAAAGACTCGGTGGTTAC		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Eutrema wasabi</i>	SFI13-Wasabi-F	GYTYGGTYGGATCGTRCGCA	166	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	15 s		
				Annealing	67°C	10 s	35	
				Extention	72°C	30 s		
	SFI13-Wasabi-R	TTGCCGAGATCGTTTTAGACT		Elongation	72°C	7 m	1	
<i>Brassica juncea</i>	SFI13-Mustard-F	TATCTCGGCTGGGTCATGCGTG	167	Ist denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
				Annealing	65°C	15 s	35	
				Extention	72°C	45 s		
	SFI13-Mustard-R	TTGCCGAGATCGTTTTAGACT		Elongation	72°C	7 m	1	

**Table 1. Information and PCR conditions of species-specific primers used in this study (continued).**

Species	Primer	Primer Sequence (5'→3')	Length (bp)	PCR condition				Target region
				Step	Temp.	Time	Cycle	
<i>Vigna radiata</i>	SFI13-Mung bean-F	KSGCAACAACCTTGTGTGA	201	1st denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	20 s		
	Annealing	65°C		10 s	35			
	Extention	72°C		30 s				
	Elongation	72°C		7 m	1			
SFI13-Mung bean-R	GATGCAAGAGCCGAGATA							
<i>Vigna angularis</i>	SFI13-Red bean-F	TCACCTCTCCAGGCAAAAC	202	1st denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
	Annealing	62°C		15 s	35			
	Extention	72°C		45 s				
	Elongation	72°C		7 m	1			
SFI13-Red bean-R	ACACCAAGTATCGCATT							
<i>Ziziphus jujuba</i>	SFI13-date-F	AAACCGCGCCAAGGAACACCT	196	1st denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
	Annealing	62°C		30 s	35			
	Extention	72°C		1 m				
	Elongation	72°C		7 m	1			
SFI13-date-R	GATGGTTCACGGGATTCTGC							
<i>Paullinia cupana</i>	SFI13-Guarana-F	CATCGTTGCCCCCAAACCT	219	1st denaturation	94°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	94°C	30 s		
	Annealing	65°C		15 s	40			
	Extention	72°C		45 s				
	Elongation	72°C		7 m	1			
SFI13-Guarana-R	CTCCCAGCCCTCGGACCCTCT							
<i>Taraxacum coreanum</i>	SFI13-coreanum-F	TCACGCATCGCGTCGCTCCTG	196	1st denaturation	95°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	95°C	30 s		
	Annealing	60°C		5 s	35			
	Extention	72°C		30 s				
	Elongation	72°C		5 m	1			
SFI13-coreanum-R	TCTTTTTTGAGGGCTTCCCTGG							
<i>Taraxacum platycarpum</i>	SFI13-Platycarpum-F	CTGTGTGTCGTGAGCTGCA	195	1st denaturation	95°C	5 m	1	<i>ITS</i>
				Denaturation	95°C	30 s		
	Annealing	60°C		5 s	35			
	Extention	72°C		30 s				
	Elongation	72°C		5 m	1			
SFI13-Platycarpum-R	GATTTTCAAGCTGGGCTAG							

Korea)를 사용하였으며, 전기영동 완료 후 UV 투영기를 이용하여 결과를 확인하였다.

### 결과 및 고찰

본 연구에서는 버섯류를 포함한 21 종의 대상시료에 대하여 식품 중 식물성 사용원료 진위 판별을 위한 유전자 판별법을 개발하였다. 이를 위하여 유전자는행에 등록되어 있는 대상 시료 및 비교 시료의 *ITS* 또는 *matK* 유전자 부위의 염기서열 데이터를 확보하고 비교 분석하여 종 특이 프라이머를 설계하였다. 먼저, 버섯류에 속하는 팽이버섯, 표고버섯, 양송이버섯, 새송이버섯, 느타리버섯 및 영지버섯은 *ITS* 유전자 부위에서 중간 상동성이 비교적 높은 부위에서 6 종의 역방향 프라이머를 설계하였고, 정방향 프라이머는 염기서열이 비교적 다양한 부위를 이용하여 각각 설계하였으며, 대상종과 비교종은 6 종의 버섯류를 상호 교차 실험하였다. 견과류 중 밤은 고구마, 울금, 호두, 잣

및 도토리, 잣은 호두, 포도, 호박씨, 해바라기씨 및 땅콩, 호두는 잣, 아몬드, 땅콩 및 밤을 각각 비교종으로 하였으며 *matK* 유전자 부위에서 비교종들과 염기서열이 상이한 부위를 프라이머로 설계하여 실험에 이용하였다. 과실류에 속하는 대추는 블루베리, 포도를 비교종으로 하여 *ITS* 유전자 부위에서 프라이머를 설계하였고 채소류 중 알로에는 오이, 양파, 배추, 마늘, 호박, 수박 및 참외, 미나리는 배추, 녹차, 시금치, 클로렐라 및 스피루리나, 부추는 파와 쪽파, 오이는 알로에, 양파, 배추, 마늘, 호박, 수박 및 참외, 고추냉이는 후추, 겨자 및 무, 겨자는 후추, 고추냉이 및 무를 각각 비교종으로 하여 *ITS* 유전자 부위에서 비교종들과 염기서열이 상이한 부위를 프라이머로 설계하였다. 콩류 또한 *ITS* 유전자 부위에서 프라이머를 설계하였는데 녹두는 팥, 옥수수, 고구마, 완두, 감자 및 밀, 팥은 녹두, 옥수수, 고구마, 완두, 감자 및 밀을 비교종으로 하였다. 마지막으 건강식품의 원료로 많이 이용되는 과라나는 단풍나무, 커피 및 카카오, 흰민들레와 민들레는 서양민들레를 비

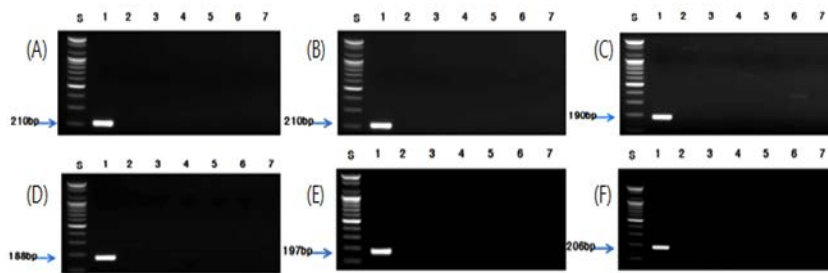


Fig. 2. PCR results from various mushrooms by PCR using optimised species-specific primer. (A) Lane 1; *Flammulina velutipes*, Lane 2; *Pleurotus ostreatus*, Lane 3; *Auricularia auricula-judae*, Lane 4; *Lentinula edodes*, Lane 5; *Ganoderma lucidum*, Lane 6; *Agaricus bisporus*, Lane 7; *Pleurotus eryngii*. (B) Lane 1; *Lentinula edodes*, Lane 2; *Pleurotus ostreatus*, Lane 3; *Auricularia auricula-judae*, Lane 4; *Flammulina velutipes*, Lane 5; *Ganoderma lucidum*, Lane 6; *Agaricus bisporus*, Lane 7; *Pleurotus eryngii*. (C) Lane 1; *Agaricus bisporus*, Lane 2; *Pleurotus ostreatus*, Lane 3; *Auricularia auricula-judae*, Lane 4; *Flammulina velutipes*, Lane 5; *Lentinula edodes*, Lane 6; *Ganoderma lucidum*, Lane 7; *Pleurotus eryngii*. (D) Lane 1; *Pleurotus eryngii*, Lane 2; *Pleurotus ostreatus*, Lane 3; *Auricularia auricula-judae*, Lane 4; *Flammulina velutipes*, Lane 5; *Lentinula edodes*, Lane 6; *Ganoderma lucidum*, Lane 7; *Agaricus bisporus*. (E) Lane 1; *Pleurotus ostreatus*, Lane 2; *Auricularia auricula-judae*, Lane 3; *Flammulina velutipes*, Lane 4; *Lentinula edodes*, Lane 5; *Ganoderma lucidum*, Lane 6; *Agaricus bisporus*, Lane 7; *Pleurotus eryngii*. (F) Lane 1; *Ganoderma lucidum*, Lane 2; *Pleurotus ostreatus*, Lane 3; *Auricularia auricula-judae*, Lane 4; *Flammulina velutipes*, Lane 5; *Lentinula edodes*, Lane 6; *Agaricus bisporus*, Lane 7; *Pleurotus eryngii*.

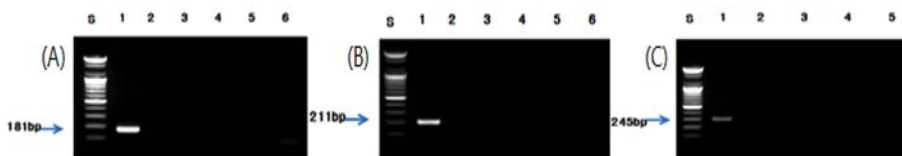


Fig. 3. PCR results from various nut seeds by PCR using optimised species-specific primer. (A) Lane 1; *Castanea crenata* Sieb, Lane 2; *Ipomoea batatas*, Lane 3; *Curcuma longa*, Lane 4; *Juglans regia*, Lane 5; *Pinus koraiensis*, Lane 6; *Quercus acutissima* Carr. (B) Lane 1; *Pinus koraiensis*, Lane 2; *Juglans regia*, Lane 3; *Vitis vinifera* L., Lane 4; *Cucurbita moschata*, Lane 5; *Helianthus annuus*, Lane 6; *Arachis hypogaea*. (C) Lane 1; *Juglans regia*, Lane 2; *Pinus koraiensis*, Lane 3; *Prunus dulcis*, Lane 4; *Arachis hypogaea*, Lane 5; *Castanea crenata* Sieb.

교종으로 하여 ITS 유전자 부위에서 각각의 프라이머를 설계하였다. 21 종의 식물원료 프라이머는 가공식품에 대하여 적용이 가능하도록 하기 위하여 가급적 200 bp 내외가 되도록 설계하였고, 이를 이용하여 선정된 식물원료에 대한 PCR 조건을 최적화 하였다(Table 1).

각각의 종 특이 프라이머를 사용하여 최적화 된 조건으로 PCR을 수행한 결과, 버섯류인 팽이버섯, 표고버섯, 양송이버섯, 영지버섯, 새송이버섯 및 느타리버섯은 각각 210, 210, 190, 188, 197 및 206 bp(Fig. 2), 견과류인 밤, 잣 및 호두는 각각 181, 211 및 245 bp(Fig. 3), 과실류인 대추는 196 bp(Fig. 4), 채소류인 알로에, 미나리, 부추, 오이, 고추냉이 및 겨자는 각각 175, 193, 235, 178, 166 및 167 bp(Fig. 5), 두류인 녹두와 팥은 201 bp와 202 bp(Fig. 6), 그리고 과라나, 흰민들레 및 민들레에 대하여 각각 219, 196 및 195 bp(Fig. 7)의 예상된 크기의 증폭 산물을 확인할 수 있었고, 선정된 대상종 이외의 비교종에서는 비 특이적인 밴드는 생성되지 않았다.

따라서 본 연구에서 개발된 21 종의 식물성 식품원료에 대한 종 특이 프라이머는 육안 확인이 어려운 가공식품 등

을 대상으로 간단하고 정확하게 사용원료의 진위 여부를 확인할 수 있으며, 일반 프라이머가 가지고 있는 식품 적용 한계를 극복할 수 있을 것이라고 판단하였다. 하지만 대상종에 대한 비교종의 선택에 있어 색, 식감 등에 기준을 두었지만 비교종과의 유전적 연관관계를 추가적으로 확인할 필요가 있다. 현재까지 개발된 판별법을 활용하여 건전한 식품제조업체를 보호하고 정확한 표시사항 준수를 통한 소비자 보호와 불량식품 근절에 적극 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

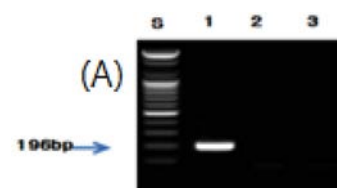


Fig. 4. PCR results from fruits by PCR using optimised species-specific primer. Lane 1; *Ziziphus jujuba*, Lane 2; *Vaccinium corymbosum*, Lane 3; *Vitis vinifera* L.

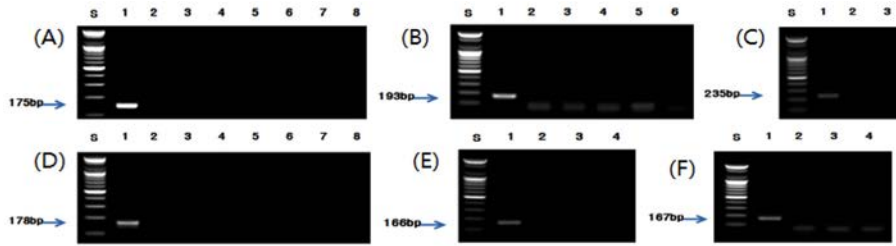


Fig. 5. PCR results from various vegetables by PCR using optimised species-specific primer. (A) Lane 1; *Aloe vera*, Lane 2; *Cucumis sativus*, Lane 3; *Allium cepa*, Lane 4; *Brassica campestris*, Lane 5; *Allium scorodopasum*, Lane 6; *Cucurbita moschata*, Lane 7; *Citrullus lanatus*, Lane 8; *Cucumis melo var. makuwa*. (B) Lane 1; *Oenanthe javanica*, Lane 2; *Brassica campestris*, Lane 3; *Camellia cinensis*, Lane 4; *Spinacia oleracea*, Lane 5; *Chlorella*, Lane 6; *Spirulina platensis*. (C) Lane 1; *Allium tuberosum*, Lane 2; *Allium fistulosum L.*, Lane 3; *Allium scalonicum*. (D) Lane 1; *Cucumis sativus*, Lane 2; *Aloe vera*, Lane 3; *Allium cepa*, Lane 4; *Brassica campestris*, Lane 5; *Allium scorodopasum*, Lane 6; *Cucurbita moschata*, Lane 7; *Citrullus lanatus*, Lane 8; *Cucumis melo var. makuwa*. (E) Lane 1; *Eutrema wasabi*, Lane 2; *Piper longum*, Lane 3; *Brassica juncea*, Lane 4; *Raphanus sativus*. (F) Lane 1; *Brassica juncea*, Lane 2; *Piper longum*, Lane 3; *Eutrema wasabi*, Lane 4; *Raphanus sativus*.



Fig. 6. PCR results from various pulse crops by PCR using optimised species-specific primer. (A) Lane 1; *Vigna radiatus L.*, Lane 2; *Vigna angularis*, Lane 3; *Zea may*, Lane 4; *Ipomea batatas*, Lane 5; *Pisum sativum*, Lane 6; *Solanum tuberosum*, Lane 7; *Triticum aestivum*. (B) Lane 1; *Vigna angularis*, Lane 2; *Vigna radiatus L.*, Lane 3; *Zea may*, Lane 4; *Ipomea batatas*, Lane 5; *Pisum sativum*, Lane 6; *Solanum tuberosum*, Lane 7; *Triticum aestivum*.

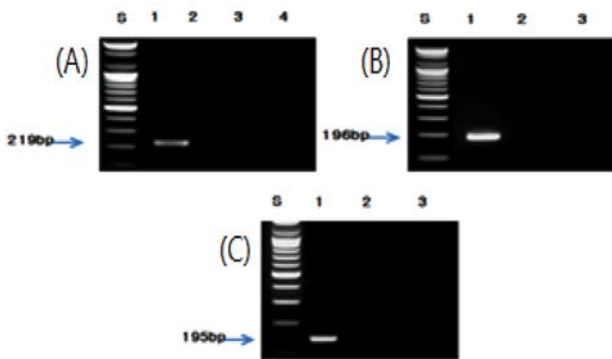


Fig. 7. PCR results from guarana and dandelion by PCR using optimised species-specific primer. (A) Lane 1; *Paullinia pachycarpa*, Lane 2; *Acer palmatum*, Lane 3; *Coffea arabica*, Lane 4; *Theobroma cacao*. (B) Lane 1; *Taraxacum coreanum*, Lane 2; *Taraxacum platycarpum*, Lane 3; *Taraxacum officinale*. (C) Lane 1; *Taraxacum platycarpum*, Lane 2; *Taraxacum coreanum*, Lane 3; *Taraxacum officinale*.

요 약

본 연구에서는 식품 중 식물성 식품원료의 진위 판별을 위하여 분자생물학적 기법을 이용한 판별법을 개발하였다.

종 판별을 위한 유전자로 엽록체에 존재하는 *matK* 유전자와 핵 내에 존재하는 *ITS* 유전자 부분을 대상으로 하였으며, 가공식품에의 적용을 고려하여 PCR 산물의 크기는 200 bp 내외가 되도록 종 특이 프라이머(species-specific primer)를 설계하였다. 대상종으로는 버섯류 6 종(팽이버섯, 표고버섯, 양송이버섯, 영지버섯, 새송이버섯 및 느타리버섯), 견과류 3 종(밤, 잣 및 호두), 과실류 1 종(대추), 채소류 6 종(알로에, 미나리, 부추, 오이, 고추냉이 및 겨자), 콩류 2 종(녹두, 팥) 및 기타 3 종(과라나, 흰민들레 및 민들레), 총 21 종을 선정하였으며, 종 특이 프라이머를 이용하여 예상되는 PCR 산물의 생성 유무를 확인하였다. PCR 분석 결과, 21 종의 식물성 식품원료에 대하여 각각 예상된 PCR 산물을 확인하였으며, 프라이머별로 비교중에서 비 특이적 PCR 산물(non-specific PCR product)이 생성되지 않음을 확인하였다. 본 연구에서 개발된 종 특이 프라이머는 가열 및 가공된 식품 중 21 종의 식물성 식품원료의 진위 판별에 이용될 것이며, 불량식품 근절에 적극 활용될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전평가원 2013년도 연구개발사업 지원비(13161소비자102)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

Chase M.W, Cowan R.S, Hollingsworth P.M, Van den Berg C, Madrinan S. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*. 56: 295-299.  
 Chen S, Song J. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5: e8613.

- Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Lim SS. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1087-1096.
- Choi YH, Kim MJ, Lee HS, Yun BS, Hu C, Kwak SS. 1998. Antioxidative compounds in aerial parts of *Potentilla fragaroides*. *Korean J. Pharmacogn.* 29: 79-8.
- Fabric T, Celia M, Catherine H. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* 23: 359-366.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Bio. Biotechnol.* 3: 294-299.
- Harmer J.E, Farrall L, Ortach M.J, Valent B, Chunmley F.G 1989. Host species-specific conservation of a family of repeated sequence in the genomic of a fungal plant pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 9981-9985.
- Hebert P.D.N, Cywinska A, Shelley L.B, Jeremy R. 2003. Biological identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313-321.
- Herbert P.D.N, Retnasingham S, DeWaard J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: S96-S99.
- Hong EJ, Kim KH, Park SJ, Kang JW, Kim DS, Lee HJ, Kim EJ, Lee JH, Lee KH, Noh BS. 2011a. Discrimination of shreds of frozen and dried alaska pollack, dried pollack and cod using electronic nose. *Food Eng. Progress.* 15: 162-168.
- Hong EJ, Kim KH, Park SJ, Kang JW, Kim DS, Lee HJ, Kim EJ, Lee JW, Kim SH, Lee KH, Noh BS. 2011b. Discrimination of the salted cuttle fish and the salted mitra squid in economically motivated authentication food using electronic nose based on mass spectrometer. *Food Eng. Progress.* 15: 122-129.
- Kocher T.D, Thomas W.K, Meyer A, Edwards S.V, Paabo S, Vellablanca F.X. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6196-6200.
- Kress W.J, Erickson D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. *PLoS ONE* 2: e508.
- Kress W.J, Erickson D.L. 2008. DNA barcodes : genes, genomics, and bioinformatics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 2761-2762.
- Kress W.J, Wurdack K.J, Zimmer E.A, Weigt L.A, Janzen D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 8369-8374.
- Lahaye R, Van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 2923-2928.
- Maua J.L, Lina H.C, Song S.F. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res. Int.* 35: 519-526.
- Monaghan M.T, Michael B, Gregory T.R, Vogler A.P. 2003. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers, *Philos. Trans R. Soc. Lond. B.* 270: 313-321.
- Padovan G.J, De Jong D, Rodrigues L.P, Marchini J.S. 2003. Detection of adulteration of commercial honey samples by the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratio. *Food Chem.* 82: 633-636.
- Park YC, Jin SO, Lim JY, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Han SB, Lee SJ, Lee KH, Yoon HS. 2012a. Application for identification of food raw materials by PCR using universal primer. *J. Fd. Hyg. Safety* 27: 317-324.
- Park YC, Lim JY, Kim MR, Park YE, Lim JD, Hwang CR, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Lee SJ, Han SB. 2012b. Identification of faulty red pepper powder containing seasoned red-pepper sauce. *J. Fd. Hyg. Safety* 27: 182-187.
- Park YC, Kim MR, Lim JY, Park YE, Shin JH, Hwang CR, Lim JD, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Han SB. 2012c. A comparison of gene extraction methods for the Identification of raw materials from meat products. *J. Fd. Hyg. Safety* 27: 146-151.
- Park YC, Ahn CY, Jin SO, Lim JY, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Park KS, Yoon HS. 2012d. Identification of Raw Materials in Processed Meat Products by PCR Using Species-Specific Primer. *J. Fd. Hyg. Safety* 27: 68-73.
- Park YC, Jin SO, Kim MR, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Han SB. 2012e. Detection Method for Identification of *Pueraria mirifica* (Thai kudzu) in Processed Foods. *J. Fd. Hyg. Safety* 27: 466-472.
- Park YC, Kim MR, Jung YH, Shin JH, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Han SB. 2013. Development of Detection Method for Oilfish (*Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybrium flavobrunneum*) as a Food Materials not Usable in Foods. *J. Fd. Hyg. Safety* 28: 50-55.
- Schellenberg A, Chmielus S, Schlicht C, Camin F, Perini M, Bontempo L, Heinrich K, Kelly S.D, Rossmann A, Thomas F, Jamin E, Horacek M. 2010. Multielement stable isotope ratio (H, C, N, S) of honey from different european regions. *Food Chem.* 121: 770-777.
- Tomoaki M, Atsushi A, Takuma T, Sumitaka Y, Yutaka O, Yoshida M. 2009. Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA Gene. *Legal Med.* 11: 449-450.
- White J.J, Bruns J, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungus ribosomal RNA genes for phylogenics. A guide to methods and application. Academic press 315-322.
- Yanga J.H, Lina H.C, Mau J.L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushroom. *Food Chem.* 77: 229-23.