

Real Time PCR을 활용한 가공식품에서의 밀 검출에 관한 연구

신상운* · 김영숙 · 김양희 · 박은미 · 조상훈 · 엄경숙 · 강효정 · 윤미혜

경기도보건환경연구원 보건연구기획팀

Detection of Wheat in Processed Food Using Real Time PCR

Sang-Woon Shin*, Young-Sug Kim, Yang-Hee Kim, Eun-Mi Park, Sang-Hoon Cho,
Kyoung-Suk Eum, Hyo-Jeong Kang and Mi-Hye Yoon

Public Health Research Planning Team, Gyeonggi-Do Institute of Health and Environment

Abstract

This study constructed a wheat-specific primer and a probe using the internal transcribed spacer (ITS). 2 regions of wheat (*Triticum aestivum*) and real-time PCR conditions were established. The calibration curve showed a slope of -3.356, a correlation coefficient of 0.998, and an amplification efficiency of 98.589%. Experiments were carried out on the rice flour mixed with 50%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, and 0.001% of wheat. The result showed that it was possible to detect samples mixed with up to 0.01% of wheat. As a result of checking, the wheat detection potential of rice, 34 processed foods, and seven processed foods was ascertained. The real-time PCR method using the wheat-specific primer and probe developed in this study can be used to identify the authenticity of the raw materials, such as the incorrect indication of the raw materials utilized and the unintended mixing of wheat during the manufacturing process.

Key words: wheat, ITS 2, real-time PCR

서 론

가짜식품(economically motivated adulteration, EMA)이란 경제적 이득을 취하기 위하여 원재료를 속이고, 의도적으로 저렴한 원료를 사용하는 등 부당한 방법으로 제조된 식품을 의미한다(Kim *et al.*, 2014). 가짜 식품의 한 예로 쌀 과자에 밀 등 기타재료를 섞어넣고도 쌀과자로 속여 부당 이익을 얻거나 하는 등의 부정식품 판매 업체 58곳을 적발하였다는 언론보도사례 등이 발생 되고 있다([Http://news.jtbc.joins.com/article/article.aspx?news_id=NB11162064](http://news.jtbc.joins.com/article/article.aspx?news_id=NB11162064)). 외국의 경우 미국 식품의약품청, 영국 식품기준청 그리고 캐나다 국경관리청과 같은 정부기관들에서 가짜 식품을 비롯한 불량식품의 관리를 강화하고 있고, 우리나라도 2010년부터 식품의약품안전처에서 다소비식품을 대상으로 유전자 분석을 활용한 식품원료의 진위 판별법을 마련하고 있다(Hong *et al.*, 2015). 혼합식품이나 가짜식품 등을 가공하거나 처리하였을 경우 외관으로 원재료의 판별이 거의 불가능하기

때문에 원재료의 정확한 표시와 원재료를 정확하게 검증할 수 있는 과학적인 기술개발이 중요하다. 원재료 검증 방법에는 원재료의 특정 성분 물질의 유무를 확인할 수 있는 이화학적 분석법(Schellenberg *et al.*, 2010), 면역효소측정법과 등전점 전기영동법으로 대표되는 단백질 분석법 그리고 DNA분자수준에서의 염기서열 차이에 기초한 PCR 기법 등과 같은 유전자 분석법(Folmer *et al.*, 1994; Fabric *et al.*, 2005)이 있다. 이화학적 분석법은 방법이 복잡하고 고가의 분석기기를 필요로 하기 때문에 적용이 쉽지 않고, 단백질 분석법은 동종간 판별이 어려울 뿐만 아니라 열처리 과정을 거친 가공품인 경우 항원의 변성으로 감수성이 떨어진다. 그러므로 최근에는 열에 비교적 안정한 유전자를 대상으로 유전자 분석법이 사용되고 있다. 그 중 PCR을 이용한 유전자 검출 방법은 특이성, 민감성이 매우 높고 식품가공이나 제조 과정 중에서도 단백질에 비해 비교적 안정한 물질이므로 외부적 환경 요인에 큰 영향을 받지 않기 때문에 분석결과의 오차를 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다(Hebert *et al.*, 2003; Monaghan *et al.*, 2003).

PCR을 이용한 식품원료의 유전자분석법에는 일반 프라이머(universal primer)를 이용하여 증폭 후 염기서열을 결정하고 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행에 등록되어있는 염기서열과 비교하여 종을 판별하는 방법과 종

*Corresponding author: Sang-Woon Shin, Public Health Research Planning Team, Gyeonggi-Do Institute of Health and Environment, Suwon-si Gyeonggi-do, 16205, Korea
Tel: +82-31-250-2582; Fax: +82-31-250-2588
E-mail: bearwoon@gg.go.kr
Received October 17, 2019; accepted November 17, 2019

특이프라이머(species-specific primer)를 이용하여 유전자 증폭 유무로 판별하는 방법(Kocher *et al.*, 1989)이 있다. 특히, 가공식품은 제조 가공과정 중 고압살균, 화학작용 등에 의해 DNA가 손상될 가능성이 있기 때문에 일반프라이머를 이용한 염기서열 분석은 PCR증폭 산물의 크기가 700 bp 이상으로 가공식품에 적용하기가 어려워 PCR증폭 산물의 크기를 200 bp 내외가 되도록 설계하고 이를 이용하여 증폭 여부로 종을 확인하는 방법(Park *et al.*, 2012a; Park *et al.*, 2012b; Park *et al.*, 2012c; Park *et al.*, 2012d; Park *et al.*, 2012e; Park *et al.*, 2013)이 많이 활용된다. 특히, real time PCR분석법의 경우 기존의 PCR방법보다 빠른 시간 내에 높은 감도로 증폭할수 있고, 프로브를 사용하여 기존PCR의 위양성을 효과적으로 줄일 수 있어 신뢰성을 높일수 있다는 평가를 받고 있다(Chung *et al.*, 2018). 사용원료의 부정확한 표시나 제조 과정 중 원재료 외 다른 원료들의 비의도적 혼입을 통제하기 위해서는 제품에 함유된 원료 물질을 모니터링 할 수 있는 효율적이고 정확한 분석방법의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 쌀 등의 가공식품에서 밀의 혼입 여부를 판별하기 위해서 다른 영역에 비해 빠른 진화 속도를 보여 중간, 종내 및 집단 내에서 변이조사 등에 광범위하게 이용되고 있는 internal transcribed spacer (*ITS*)영역(Kress *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2007; Kress *et al.*, 2008; Lahaye *et al.*, 2008)의 밀 구분마커로서 유용성과 real-time PCR 분석법의 활용가능성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

재료 및 분석기기

실험에 사용한 쌀과 밀 그리고 그 가공식품들은 2018년 6월부터 11월까지 경기도의 중소형유통매장 및 재래시장에서 구입하였다. 곡류는 막자사발을 이용하여 균질하게 분쇄하였고, 과자류는 분쇄 후 증류수로 3회 세척하였으며, 떡류는 고물이 있는 경우는 고물을 제거한 후 떡 부분만을 채취하여 분쇄한 것을 검체로 사용하였다. Real time PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 사용하였다.

유전자추출

DNA추출은DNeasy Plant mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하였고, 추출 방법은 쌀과밀 원재료는 제조사에서 제공하는 방법에 따라 추출하였으며, 과자와 떡 등의 가공식품은 추가로 α -amylase를 proteinase K와 동량, 동일시간 처리 하였다.

염기서열 분석 및 프라이머 제작

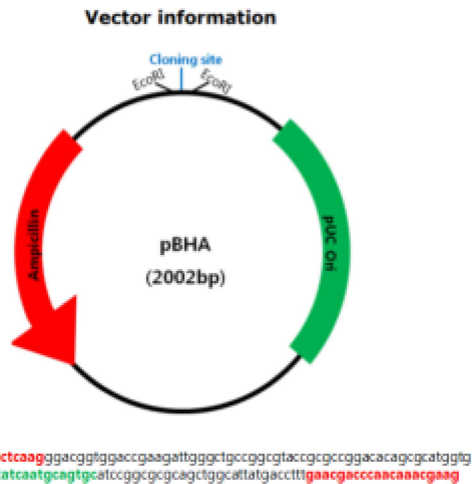
밀(*Triticum aestivum*, access number: FJ609737, FM998884, KC589709, KF482082)과 쌀(*Oryza sativa*, access number: KM036285)의 *ITS2* (Internal transcribed spacer) 염기서열은 National Center Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 염기서열로부터 확보하였다. 확보된 쌀과 밀의 *ITS2* 염기서열은 Lasergene (Copyright



Fig. 1. Alignment of wheat & rice *ITS2* sequence. Access numbers of FJ609737, FM998884, KC589709 and KF482082 are wheat (*Triticum aestivum*). Access number of KM036285 is rice (*Oryza sativa*).

Table 1. Information and real-time PCR conditions of species-specific primers and probe used

Primer	Sequence (5'→3')	Length (bp)	PCR condition				Target region
			Step	Temp.	Time	Cycle	
Forward	ctggtcctcgtctctcaag	154	Pre denaturation	95°C	4 min	1	ITS
Probe	FAM-tcgccttatcaatgcagtgac-BHQ1		Denaturation	95°C	30 sec	40	
Reverse	cttcgtttgttggtcgttc		Annealing & Extension	60°C	30 sec		

**Fig. 2. Wheat standard in pHBA vector.**

1997 by DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)의 MegAlign Programme을 통해서 비교 분석하였다(Fig. 1). 프라이머 및 프로브는 Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)를 사용하여 설계하고 바이오니아(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 합성하였다.

유전자 증폭

유전자 증폭을 위해 AccuPower PlusDualStar qPCR 2X Master mix (Bioneer, Korea)를 사용하였고 주형DNA 100 ng/μL, 10 pM의 정방향 및 역방향 프라이머 각각 1 μL, 프로브 0.5 μL, 50XROX dye 0.4 μL, 2X Maxter mix 10 μL 그리고 최종 용량이 20 μL가 되도록 증류수를 첨가하였다. 본 연구에서 개발된 프라이머 및 프로브의 염기서열 및 검출을 위한 최적의 반응 조건은 Table 1에 나타내었다.

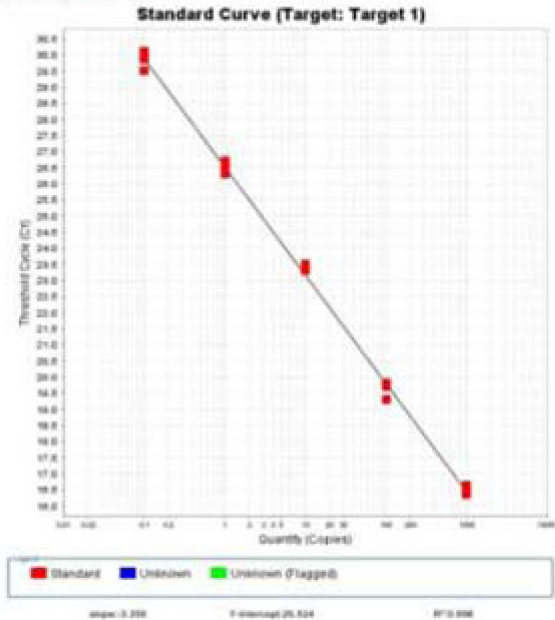
밀 유전자 표준품

밀 유전자 증폭산물 154 bp에 해당하는 염기서열의 합성 및 2,002 bp의 pHBA vector에 삽입한 총 2,156 bp의 유전자 표준 DNA는 바이오니아(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 합성하였다(Fig. 2).

결과 및 고찰

밀(*Triticum aestivum*, access number: FJ609737,

Standard Curves

**Fig. 3. Standard curve of wheat standard.**

FM998884, KC589709, KF482082)과 쌀(*Oryza sativa*, access number: KM036285)의 ITS2 (internal transcribed spacer)부위 염기서열을 확보하여 상이한 부위를 이용, 밀 특이 프라이머 및 프로브를 제작하고 증폭 산물 154 bp의 염기서열은 미국 국립보존원 유전자은행에 등록되어있는 염기서열과 비교하여(NCBI nblast)밀 특이 프라이머로서의 가능성을 확인하였다. 밀 유전자 표준품을 10 ng부터 10배씩 1 pg 농도까지 단계희석하고 본 연구에서 제작한 프라이머를 사용하여 real-time PCR 3회 반복한 결과에서 standard curve 기울기(slope)는 -3.356, 상관 계수(R^2)는 0.998, 증폭 효율은 98.589%를 나타내었다(Fig. 3). 쌀 가공식품에서의 밀 검출 효율을 알아보기 위해 쌀가루에 통밀가루를 50%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01% 그리고 0.001%가 되도록 각각 혼합한 시료를 만들어 실험한 결과 밀이 0.01%까지 혼합된 시료까지 검출이 가능함을 알 수 있었다. 밀과 쌀 가공식품 31개와 원재료 3개, 모두 34개 종류의 시료에서 밀 특이 프라이머 및 프로브를 이용한 real-time PCR 분석결과는 Table 2와 같다. 밀, 메밀 그리고 쌀 각각 1개의 원재료 시료 중 밀 시료에서만 밀특이 유전자가 검출되어 밀에

Table 2. Results of real-time PCR with wheat specific primer and probe

Kinds of sample	Number of samples		Sum of samples
	Detected	Not detected	
Half-moon-shaped rice cake	-	1	1
Steamed rice cake	-	2	2
Pumpkin cake	-	1	1
Bean rice cake	-	1	1
Glutinous rice cake	-	8	8
Rice cake soup	-	6	6
Tteokbokki wheat cake	2	-	2
Tteokbokki rice cake	3	-	3
Rice pop crispy	1	6	7
Wheat	1	-	1
Buck wheat	-	1	1
Rice	-	1	1

대한 특이성이 확인되었다. 떡볶이떡을 제외한 쌀떡이라고 표기된 떡 19개의 시료(모시떡 1, 시루떡 2, 호박떡 1, 콩떡 1, 찹쌀떡 2, 인절미 2, 모찌떡 2, 증편 2, 떡국떡 6)에서는 모두 밀 특이 유전자가 검출되지 않았다. 쌀과자는 7개의 시료(빵튀기 2, 누룽지 2, 쌀과자 3) 중 밀 40%가 포함되어있다고 성분 표시된 1개의 시료(빵튀기)에서만 밀 특이 유전자가 검출되었다. 떡볶이 떡은 5개의 시료 모두에서 밀 특이 유전자가 검출되었다. 제품명이 밀 떡볶이라고 표기된 2개의 제품과 쌀 떡볶이로 표기된 3개의 제품이였다. 제품명이 쌀 떡볶이로 표기된 3개의 제품은 함량은 표기되어있지 않았지만 성분표에서 소맥분(밀)이 포함되어있다는 것을 확인할 수 있었다. 재래시장의 방앗간 등에서 판매되는 떡과 같은 가공식품은 제품에 성분표시가 되어있지 않기 때문에 원재료의 성분에 대한 정보를 전적으로 판매자의 설명에 의존하여 구매할 수밖에 없는 실정이다. 또한 쌀 떡볶이의 경우 밀에 대한 성분표시가 있더라도 쌀 떡볶이라는 제품명으로 판매되고 있는 제품들이 있어 밀에 대한 알레르기를 가진 소비자가 쌀 떡볶이로 오인하고 섭취할 가능성도 배제할 수 없다. 밀은 세계적으로 전체 단백질 소비량의 약 70% 정도를 차지하는 식품으로서 국내에서도 2014년 1인당 밀 소비량이 33.6 kg으로 1975년 이후 꾸준한 섭취량을 보이고 있으며 우유, 계란, 대두, 땅콩 등과 함께 알레르기를 일으키는 주요 원인 중 하나로 알레르기 유발물질 표시대상 21개 품목에 속해있다. 비의도적이라도 밀이 혼입된 가공식품은 특히 어린 영유아에게 급작스럽게 발생하는 심한 알레르기 과민반응으로 정의되는 아나필락시스를 일으킬 수도 있기 때문에 (Yoon *et al.*, 2016) 가짜 식품이나 비의도적인 원재료의 혼입 여부를 확인 할 수 있는 방법 개발이 중요하다. 따라서 본 연구에서 개발된 쌀과 밀의 *ITS2* (internal transcribed spacer)부위 염기서열의 중간 다양성을 이용한 real-time

PCR 방법은 가짜 식품이나 비의도적인 원재료 혼입 등을 판별해내고 불량식품 근절과 소비자에게 정확한 정보를 제공하는데 기여할 수 있을 것으로 생각 된다.

요 약

밀(*Triticum aestivum*)의 *ITS2* (Internal transcribed spacer) 부위 염기서열을 이용하여 밀 특이 프라이머 및 프로브를 제작하고 real-time PCR 조건을 정립하였다. 검량선은 기울기 -3.356, 상관계수 0.998, 증폭효율 98.589%를 나타내었다. 쌀가루에 통밀가루를 50%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01% 그리고 0.001%가 되도록 각각 혼합한 시료를 만들어 실험한 결과 밀이 0.01%까지 혼합된 시료까지 검출이 가능했다. 쌀과 밀 그리고 그 가공식품 34건을 대상으로 밀 검출 가능성을 확인한 결과 밀이 포함된 7건의 가공식품 모두 검출이 가능했다. 본연구에서 개발한 밀 특이 프라이머 및 프로브를 이용한 real-time PCR 방법은 사용원료의 부정확한 표시나 제조 과정 중 밀의 비의도적인 혼입 여부 등 식품원료의 진위 판별에 활용이 가능할 것이다.

References

- Chung IY, Seo YB, Yang JY, Kwon KS, Kim GD. 2018. Development and validation of quick and accurate cephalopods grouping system in fishery products by real-time quantitative PCR based on mitochondrial DNA. *J. Food Hyg. Saf.* 33: 280-288.
- 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.
- Hebert PDN, Cywinska A, Shelley LB, Jeremy R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313-321.
- Hong Y, Kim MJ, Yang SM, Yoo IS, Kim HY. 2015. Development of duplex PCR method for simultaneous detection of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and cat (*Felis catus*) meats. *J. Appl. Biol. Chem.* 58: 383-397.
- http://news.jtbc.joins.com/article/article.aspx?news_id=NB11162064.
- Kim KH, Kim YS, Kim MR, Lee HY, Jung YK, Lee JH, Chang HS, Park YC, Kim SY, Jang DC, Jang YM. 2014. Development of species-specific primer to determine the authenticity of vegetable raw materials in food. *Food Eng. Prog.* 18: 419-426.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Vellablanca FX. 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 WJ, Erickson DL. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the noncoding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2: e508.
- Kress WJ, Erickson DL. 2008. DNA barcodes : genes, genomics,

- and bioinformatics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 2761-2762.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. 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.
- Monaghan MT, Michael B, Gregory TR, Vogler AP. 2003. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. Philos. Trans R. Soc. Lond. B. 270: 313-321.
- 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. Food 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 redpepper sauce. J. Food 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. Food Hyg. Saf. 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. Food Hyg. Saf. 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. Food Hyg. Saf. 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 *Lepidocybium flavobrunneum*) as a food materials not usable in foods. J. Food Hyg. Saf. 28: 50-55.
- Schellenberg A, Chmielus S, Schlicht C, Camin F, Perini M, Bontempo L, Heinrich K, Kelly SD, 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.
- Yoon JS, Jeong KG, Lee SY. 2016. Usefulness of specific IgE antibody levels to wheat, gluten, and ω -5 gliadin for wheat allergy in Korean children. Allergy Asthma Respir Dis. 4: 119-125.