



Identification of marker in processed meat products of different species by using multiplex PCR

Ho-Chan Kang¹, Eun-Ho Kim², Ji-Yeong Kim², Cheol-Hyun Myung², Jae-Bong Lee³, Chae-Kyoung Yoo⁴, Hyun-Tae Lim^{1,2,*}

¹Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

²Department of Animal Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

³Korea Zoonosis Research Institute (KOZRI), Chonbuk National University, Iksan 54531, Korea

⁴Gyeongnam Animal Science & Technology (GAST), GyeongSang National University, JinJu, 52828, Korea

ABSTRACT

A processed meat product is a food that changes the character or shape of meat, and it is difficult to identify the raw meat because the original shape is destroyed. False record and disguised sales of raw meat can negatively affect not only the safety of consumers but also the income of producers. Therefore, this study was conducted to establish a multiplex PCR (polymerase chain reaction) method to simultaneously identify cattle (*Bos taurus*), pigs (*Sus scrofa*), and chickens (*Gallus gallus*), which are mainly used as raw meat in the manufacture of processed meat products. As a result of species-specific PCR of the raw meat DNA to confirm the cross-reactivity, species-specific amplification products of cattle 384 bp, pigs 249 bp, and chickens 721 bp were identified, and no other non-specific amplification appeared. Based on this, in order to evaluate the applicability in the market, multiplex PCR was performed by classifying 52 processed meat products on sale by 5 types (Ham, Tteokgalbi, Pattie, Can ham, Sausage). As a result, the indicated ingredients were detected in all products except Can ham No. 7 among 52 processed meat, and specific reactions were observed in chickens that were not marked in No. 1, No. 4 of Tteokgalbi. In particular, among the pigs and chickens marked on Can ham No. 7, only pigs showed a specific reaction, confirming the possibility of false record. If this study is used to identify the types of raw meat used in processed meat products, it is expected that it will contribute to improving awareness and promoting consumption of processed meat by reducing cases of illegal distribution and restoring consumer confidence in processed meat.

Key words: processed meat product, Species-identification., multiplex PCR, Electrophoresis

서론

식육가공품에 속하는 분쇄 및 혼합 육가공품은 원료육에 식품첨가물을 가하거나 그 원형을 알아볼 수 없도록 분쇄, 절단 등의 방법을 통해 가공한 제품을 뜻하며, 대표적인 분쇄육가공품은 프레스햄, 햄버거 패티, 미트볼 등이 있다. 현재 육가공품 시장의 규모는 1인 가구의 증가, 간편식의 대중화, 캠핑족의 증가 등으로 점차 증가하는 추세며(MFDS and NFSIS, 2020), 육가공품에 사용되는 원료육은 매우 다양하나 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 원료육은 돼지, 닭, 소 순으로 2018년 기준 전년대비 각각 20.8%, 8.5%, 1.3%로 사용량이 증가하고 있다(aTFIS, 2021). 이러한 시장 규모의 증가에 따라 식품의약품안전처는 여러 원료육을 첨가하여 생산하는 육가공품 특성을 고려하여 제품의 성분표기를 반드시 기재하는 법을 통해 위생적이고 소비자들에게 정확한 정보전달을 하도록 실시하였다(MFDS, 2021).

*Corresponding author: Hyun-Tae Lim

Department of Animal Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea and Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea
Tel: 055-772-1945 Fax: 055-772-1949 E-mail: s_hitim@gnu.ac.kr

Received: 09 December, 2021 Revised: 27 December, 2021 Accepted: 28 December, 2021



© Journal of Animal Breeding and Genomics 2021. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

제품 생산자가 의도적으로 값싼 원료를 사용하거나 불법 첨가물을 사용하는 등 소비자를 속이는 제품을 Economically Motivated Adulteration (EMA) 식품이라고 부르는데(Park et al., 2012), 이는 성분규격 및 표시기준 위반 사례에 해당하며 소비자들의 건강과 알 권리, 공정한 유통질서, 종교, 위생 등에 문제가 야기될 수 있다. 소고기에 값싼 가금류를 혼입(Ayaz et al., 2006)하는 등의 EMA 식품에 대해 미국의 의약품의약품청(Food and Drug Administration)과 영국의 식품기준청(Food Standard Agency), 유럽의 유럽연합등록기관(European Union Regulation)등 여러 국가에서 육가공품의 성분표기를 엄격하게 관리하고 있으며, 한국은 식품의약품안전평가원에서 PCR을 이용한 유전자 판별법을 개발하여 관리를 하고있다. 하지만 이 방법은 하나의 primer를 이용한 Single PCR 방법으로 동시에 여러 종을 식별하기는 어려운 실정이다(NIFDSE, 2013; Kim, 2016).

DNA 분석법 중 종 특이성 primer를 이용한 single PCR로 원료육 분석연구가 진행되었지만(Lahiff et al., 2001; Kesmen et al., 2007; Park et al., 2012; Barakat et al., 2014), 혼합된 원료육 가짓수에 따라 여러 번 분석해야 하는 단점이 있다. 그에 비해 두 가지 이상의 primer를 사용하여 다수의 target DNA를 동시에 증폭할 수 있는 multiplex PCR 기법(Markoulatos et al., 2002)은 PCR 조건 최적화와 primer 설계 등 실험 설계 단계에서 복잡성이 있지만, 혼합된 시료에서 여러 종을 신속하고 간편하게 검출해 낼 수 있는 장점이 있다(Markoulatos et al., 2002, Dalmaso et al., 2004; Fumain et al., 2013; Nejad et al., 2014; Yoon, 2014). 따라서, 본 연구는 일차적으로 육가공품에 주로 이용되는 소, 돼지, 닭 3종의 식육에 대한 종 식별을 위해 종 특이성 primer를 설계하여 식육원료에 적용한 후, 최종적으로 multiplex PCR을 이용하여 동시에 소, 돼지, 닭 3종의 식육에 대한 종을 식별할 수 있는 시스템을 구축하고 육가공품에 대한 적용 가능성 확인을 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 DNA 추출

종 식별을 위해 사용된 식육원료는 소(*Bos taurus*), 돼지(*Sus scrofa*), 닭(*Gallus gallus*)이며, 소고기 12개, 돼지고기 5개, 닭고기 7개로 총 24개를 사용하였고, 육가공품은 12개 브랜드의 햄류(8개), 소시지류(23개), 떡갈비류(7개), 패티류(7개), 캔 햄류(7개)로 52개의 genomic DNA를 추출하였다. 또한, 열처리 한 원료육의 종 특이성 평가를 위해 가열육은 소, 돼지, 닭의 원료육 5g을 식육가공품의 가공조건을 고려하여 70°C에서 30분간 열처리한 후, genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 35 ng/ μ l로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

2. Primer 설계

종 특이성 primer는 Clustal W version 2.1 program (Larkin et al., 2007)을 이용하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database에서 제공된 각 mtDNA의 *D-loop*, *Cytochrome b* (*Cytb*) 염기서열을 alignment 한 뒤 Primer3 program (Untergasser et al., 2012)을 이용하였다. PCR annealing temperature 차이를 최소화하면서 각각 다른 크기로 증폭되도록 하였고, 소, 돼지는 *Cytb*, 닭은 *D-loop*에서 설계하였다(Table 1).

Table 1. Sequences of species-specific PCR primers information.

Species	Gene	Primer Sequences (5'→3')	GC%	Amplicon size (bp)
Cattle	<i>Cyt-b</i>	F : CCA TAT ATC ACC ATC GGA CAA CTA	41.67	387
		R : GGT CTG TGT ATG GGC GTG TT	55.00	
Pig	<i>Cyt-b</i>	F : TAT TCG CTA TCT ACA TGC AAA CG	39.13	249
		R : ACG AGG TCT GTT CCG ATA TAA GG	47.83	
Chicken	<i>D-loop</i>	F : CCA CAT TTC TCC CAA TGT CC	50.00	721
		R : TAT GTC CGA CAA GCA TTC AC	45.00	

3. 종 특이성 PCR

종 특이성 PCR은 각 시료에서 추출된 DNA를 이용하여 축종 별 제작된 primer의 특이성을 평가하기 위해 수행되었다. Template DNA는 3 µl이며, PCR 반응액 조성은 10x reaction Buffer, 12 mM dNTP mixture, 0.5 unit prime Taq DNA polymerase (Genet bio, Korea), 10 pmol primer를 포함해 총 25 µl로 수행되었다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 denaturation, 94°C에서 1분간 denaturation, 66°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 30회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 추가로 extension을 수행하였다.

4. Multiplex PCR

각 축종을 동시에 검출 가능한 multiplex PCR 방법을 개발하기 위해 3가지 소, 돼지, 닭 원료육의 DNA를 동량 비율로 섞어 template DNA로 사용하였고, 종 특이성 primer set를 이용하여 분석하였다. PCR 반응액은 앞선 종 특이성 PCR 방법에서 primer Taq DNA polymerase (Genet bio, Korea)를 1 unit으로 변경하여 사용하였고, PCR 반응조건은 동일하게 수행하였다. 이후, 구축된 primer set를 육가공품의 적용 가능성을 확인하기 위해 육가공품에서 추출한 DNA를 활용하여 multiplex PCR을 실시하였다.

5. 검출한계 실험

원료육과 가열육의 검출한계를 알아보기 위해 추출된 DNA를 희석하여 각 축종별 검출한계를 시험하였다. PCR을 위한 반응액 조성과 조건은 종 특이성 PCR과 같다.

결과 및 고찰

1. 종 특이성 PCR

3개 축종별 primer의 특이성을 확인하기 위하여 원료육과 가열육에서 추출한 DNA와 primer set를 사용하여 종 특이성 PCR를 실시하였고, 증폭된 산물을 전기영동하여 Fig. 1에 나타냈다. 축종별 원료육과 가열육의 PCR 결과를 살펴보면, 소는 384 bp, 돼지는 249 bp, 닭은 721 bp에 증폭된 것을 확인할 수 있었으며, 각 primer에 대한 교차반응 여부를 확인하기 위해 혼합된 DNA와 primer set를 PCR한 결과에서 다른 종과 교차반응이 일어나지 않은 것을 확인할 수 있었다.

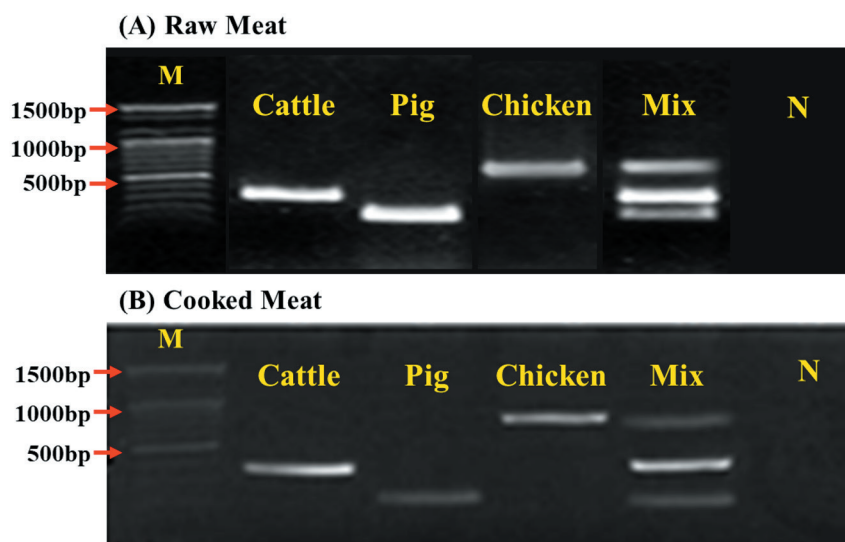


Figure 1. Agarose gel electrophoresis results of species-specific PCR for raw meat and cooked meat. M, 100 bp ladder marker; Mix, Mixed DNA; N, negative control.

2. 원료육과 가열육의 검출한계

Primer set를 이용하여 원료육과 가열육에서 추출한 DNA를 혼합하였고, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng/μl로 희석하여 종 특이성 PCR 반응조건으로 검출한계를 시험한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 원료육에서는 소, 돼지, 닭이 최대 0.01 ng/μl까지 검출되는 것을 확인하였으며, 가열육에서는 소는 최대 0.01 ng/μl, 돼지와 닭은 최대 0.1 ng/μl까지 검출되는 것을 확인하였다. Koh 등 (2011)은 소, 돼지, 닭, 오리의 DNA를 혼합하여 PCR을 수행하였는데, 소와 닭은 100 fg/μl, 돼지와 오리는 1 pg/μl까지 확인하여 소와 닭의 검출가능성이 높다고 보고하였다. 가열육의 경우 DNA 추출 시 가장 큰 영향을 받는 효과는 열처리로 DNA 붕괴의 가능성이 높다고 보고되었다(Martin et al., 2007a; 2007b). 급격한 열처리는 DNA 구조를 불안정한 상태로 만들어 DNA를 보유하고 있는 세포가 파괴 및 변형이 이루어지는데, 이 시점부터 물리적, 화학적 처리를 통한 DNA 추출의 성공률이 급격하게 떨어지게 된다. 특히, 상대적으로 큰 bp를 가진 닭의 경우는 본 연구에 사용한 primer 보다 작은 크기의 종 식별 염기서열을 발견하거나 핵에서만 DNA를 추출하는 것이 아닌 mtDNA 추출, 미량의 생물학적 검체를 통한 DNA를 추출 등 여러가지의 DNA 확보 방안을 모색하는 것이 판단된다(Holland et al., 1993; Amorim et al., 2019).

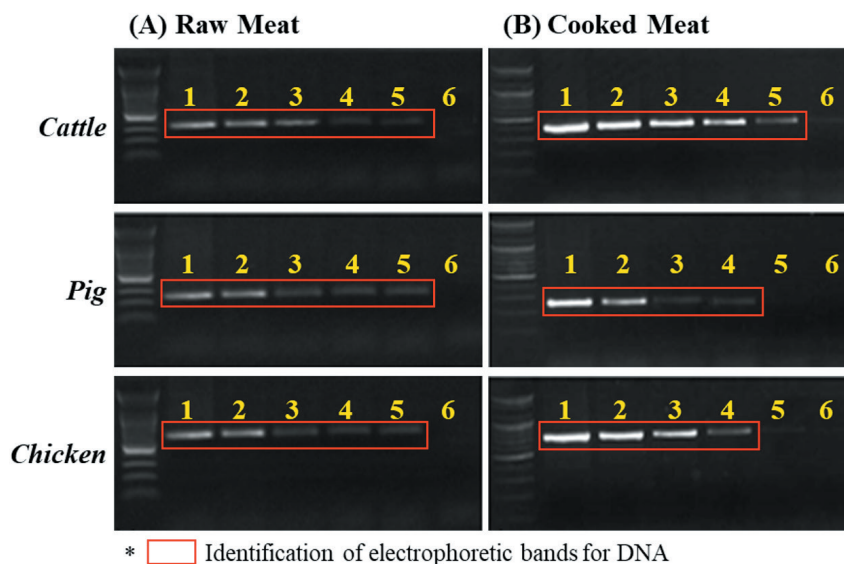


Figure 2. After dilution of DNA extracted from raw meat and cooked, electrophoresis of amplification products of species-specific PCR. Line 1, 100 ng/μl; 2, 10 ng/μl; 3, 1 ng/μl; 4, 0.1 ng/μl; 5, 0.01 ng/μl; 6, 0.001 ng/μl

3. Multiplex PCR을 이용한 육가공품 분석 결과

육가공품에서 추출한 DNA를 사용하여 multiplex PCR을 실시하였고, 증폭된 산물을 전기영동하여 Fig. 3에 나타냈다. 이후, 육가공품에 표기된 성분과 전기영동을 통한 종 식별 결과를 Table 2에 나타냈다. 햄류, 패티류, 소시지류의 표기성분과 multiplex PCR의 결과를 살펴보면, 모든 제품에서 표기된 성분과 동일하게 종 식별이 확인되었다. 반면, 떡갈비의 1번, 4번과 캔 햄의 7번에서 표기된 성분과 종 식별된 결과가 다르다는 것을 확인하였다. 떡갈비 1번, 4번에서 닭의 종 식별이 보였고, 캔 햄 7번은 표기 성분에 닭이 표기되어있으나 종 식별이 되지 않는 것을 확인하였다. Heo 등(2014)의 연구에 따르면, 쇠고기 육포에 대한 실험실 및 현장조사 실시 결과로 식육별 공정라인이 분리되어 있지 않아 돈육이 비의도적으로 혼입될 가능성을 확인하였다. 본 연구에서도 육가공품 역시 가공라인이 분리되지 않을 가능성이 있으며, 국내 제조업체에서는 기계류의 세척관리, 가공공정 개선이 필요한 것으로 사료된다. 캔 햄의 7개 제품에서 밴드가 전체적으로 흐리게 나타났는데, 이는 캔의 DNA가 잘 추출되지 않았거나 캔 가공제품의 특성상 보존을 오래하기 위해 살균을 목적으로 한 방사선 조사의 종류인 γ선 이온화 에너지를 식품에 쬔면 식품의 주형 DNA 구조가 파괴되고 이와 동시에 포름알데히드, 벤젠 등 PCR 증폭에 있어 저해물질들이 생성된 것으로 판단된다(Yoon, 2014).

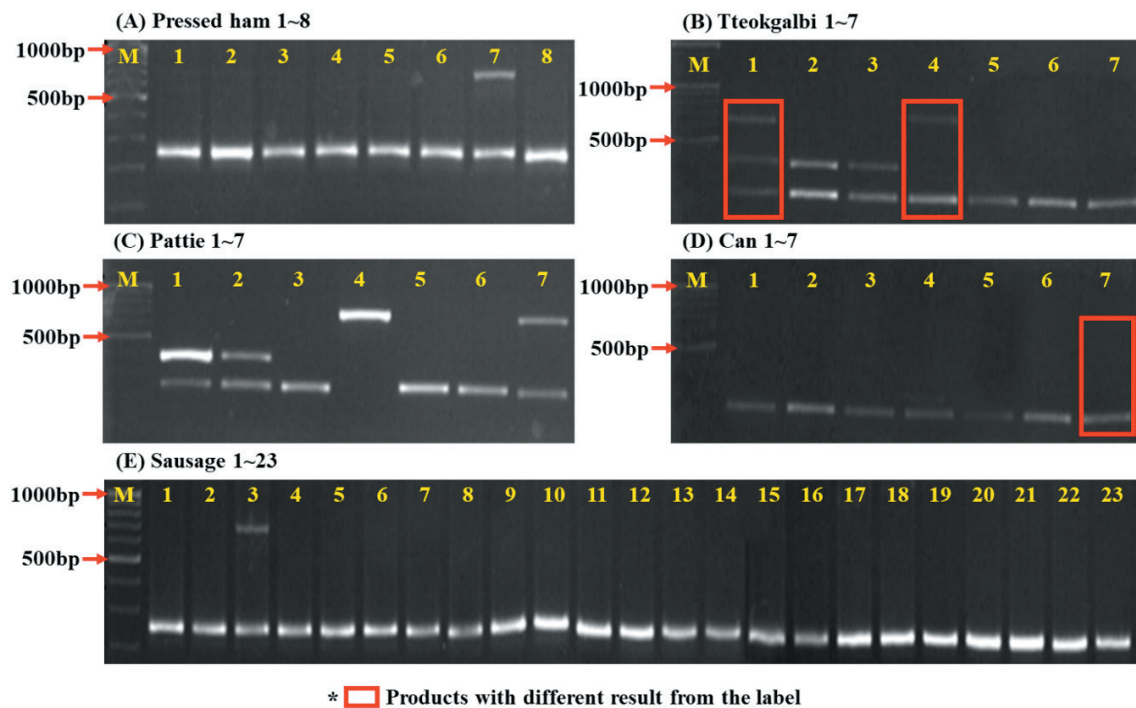


Figure 3. Electrophoresis of DNA extracted from processed meat for amplification products of multiplex PCR. M, 100 bp ladder marker.

Table 2. Species identification results through multiplex PCR and labeling ingredients for processed meat products.

Sample	Label	Multiplex PCR result	Sample	Label	Multiplex PCR result
Ham	1 Pig		Can ham	5 Pig	
	2 Pig			6 Pig	
	3 Pig			7 Pig, Chicken	- Chicken
	4 Pig		Sausage	1 Pig	
	5 Pig			2 Pig	
	6 Pig			3 Pig, Chicken	
	7 Pig, Chicken			4 Pig	
	8 Pig			5 Pig	
Tteokgalbi	1 Cattle, Pig	+ Chicken		6 Pig	
	2 Cattle, Pig			7 Pig	
	3 Cattle, Pig			8 Pig	
	4 Pig	+ Chicken		9 Pig	
	5 Pig			10 Pig	
	6 Pig, Chicken			11 Pig	
	7 Pig, Chicken			12 Pig	
Pattie	1 Cattle, Pig			13 Pig	
	2 Cattle, Pig			14 Pig	
	3 Pig			15 Pig	
	4 Chicken			16 Pig	
	5 Pig			17 Pig	
	6 Pig			18 Pig	
	7 Pig, Chicken			19 Pig	
Can ham	1 Pig			20 Pig	
	2 Pig			21 Pig	
	3 Pig			22 Pig	
	4 Pig			23 Pig	

결론

본 연구는 육가공품에서 종 식별 마커의 multiplex PCR 방법에 대한 적용 가능성을 확인하고 실시하였다. 육가공품에서 가장 많이 사용되는 소, 돼지, 닭의 종 식별 마커를 선별하여 원료육과 가열육에서 추출한 DNA를 활용하여 PCR을 실시하였다. 그 결과, 원료육과 가열육에서 소, 돼지, 닭의 종 식별 마커가 교차반응 없이 모두 식별이 가능하였고, 검출한계 실험은 원료육에서 소, 돼지, 닭이 최대 0.01 ng/μl, 가열육에서는 소는 최대 0.01 ng/μl, 돼지와 닭은 최대 0.1 ng/μl으로 가열로 인한 DNA 파괴를 고려하더라도 육가공품에서 충분히 종 식별이 가능할 것으로 판단된다. 이후, 5종류로 나눈 52개의 육가공품에 multiplex PCR를 실시하였다. 표기된 성분과 종 식별 PCR 결과, 햄류, 패티류, 소시지류에서 표기된 성분과 multiplex PCR의 종 식별 결과가 동일하였으나, 떡갈비 1번, 4번의 제품이 표기된 성분 외에 닭의 특이적 반응이 검출됨으로써 의도적 또는 비의도적으로 닭고기가 포함되어있으며, 캔 햄 7번의 제품에서 표기된 돼지, 닭 중 돼지만 특이적 반응이 검출되어 제품의 원재료명과 표기가 다른 것을 확인하였다. 본 실험을 통해 육가공품 제조 시 실제로 표기되지 않은 축종, 특히 가장 값이 저렴한 닭고기를 사용할 가능성이 있음을 확인하였으며, 허위기재의 가능성 또한 확인하였다. 육가공품 원료육 표기의 정확도 향상 및 육가공품에 대한 소비촉진을 위해 육가공품에 대한 원료육의 종 식별뿐만 아니라 원료육 성분비 판별을 위한 추가연구가 필요할 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Amorim A, Fernandes T and Taveira N. 2019. Mitochondrial DNA in Human identification: a review. *PeerJ* 7:e7314.
- aTFIS (Food Information Statistics system). 2021. March 2nd week newlateer-processed meat food. Assessed in <https://www.atfis.or.kr/article/M001010000/view.do?articleId=3686>. [in Korean]
- Ayaz Y, Ayaz ND and Erol I. 2006. Detection of species in meat and meat products using Enzyme - Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Muscle Foods* 17(2):214-220.
- Barakat H, El-Garhy HAS and Moustafa MMA. 2014. Detection of pork adulteration in processed meat by species-specific PCR-QIAxcel procedure based on D-loop and cytb genes. *Applied Microbiology Biotechnology* 98:9805-9816.
- Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S and Bottero MT. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feed stuffs. *Molecular and Cellular Probes* 18(2):81-87.
- Fumian TM, Justino MCA, Joana D, Reymao TKA, Abreu E, Soares L, Linhares AC and Gabbay YB. 2013. Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *Journal of Clinical Virology* 58(1):31-35.
- Heo EJ, Ko EK, Seo KH, Kim YJ, Park HJ, Wee SH and Moon JS. 2014. Validation of PCR and ELISA Test Kits for Identification of Domestic Animal Species in Raw Meat and Meat Products in Korea. *Journal of Food Hygiene and Safety* 29(2):158-163. [in Korean]
- Holland MM, Fisher DL, Michell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR and Weedn VW. 1993. Mitochondrial DNA sequence analysis of Human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam war. *Journal of Forensic Sciences* 38(3):542-553.
- Kesmen Z, Sahin F and Yetim H. 2007. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science* 77(4):649-653.
- Kim SH. 2016. Development of analysis system in raw meat ingredients of ground and mixed meat products using PCR assays. MS. dissertation, Gyeongsang National Univ., Jinju, Korea. [in Korean]
- Koh BRD, Kim JY, Na HM, Park SD, Kim YH. 2011. Development of species-specific multiplex PCR assays of mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA for the identification of animal species. *Korean Journal of Veterinary Service* 34(4):417-428. [in Korean]
- Lahiff S, Glennon M, Brien OL, Lyng J, Smith T, Maher M and Shilton N. 2001. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* 15(1):27-35.

- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947-2948.
- Martín I, García T, Fajardo V, López-Calleja I, Rojas M, Pavón MA, Hernández PE, González I and Martín R. 2007a. Technical note: detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Animal Science* 85(2): 452-458.
- Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Hernández PE, González I and Martín R. 2007b. Technical note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Animal Science* 85: 2734-2739.
- Markoulatos P, Siafakas N and Moncany M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16(1):47-51.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety) and NFSIS (National Food Safety Information Service). 2020. Statistics on production performance of food, etc. in 2020. Assessed in https://www.mfds.go.kr/brd/m_374/view.do?seq=30205&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1. [in Korean]
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2021. Food labeling standards. Assessed in [https://www.law.go.kr/행정규칙/식품등의표시기준/\(2021-88,20211105\)](https://www.law.go.kr/행정규칙/식품등의표시기준/(2021-88,20211105)). [in Korean]
- Nejad FP, Tafvizi F, Ebrahimi MT and Hosseini SE. 2014. Optimization of multiplex PCR for the identification of animal species using mitochondrial genes in sausages. *European Food Research and Technology* 239:533-541.
- NIFDSE (National Institute of Food and Drug Safety Evaluation). 2013. Guidelines for determining the authenticity of ingredients used in food. Assessed in http://www.kftla.or.kr/sub/sub02_03.php?boardid=data&mode=view&idx=40. [in Korean]
- Park YC, Jin SO, Lim JY, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Han SB, Lee SJ, Lee KH and Yoon HS. 2012. Application for Identification of Food Raw Materials by PCR using Universal Primer. *Journal of Food Hygiene and Safety* 27(3):317-324. [in Korean]
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115. Accessed in <http://10.1093/nar/gks596>. Epub 2012 Jun 22. PMID: 22730293; PMCID: PMC3424584.
- Yoon YM. 2014. Development of multiplex PCR for detection of pig, cow, sheep and chicken in processed food. MS. dissertation, Konkuk Univ. Seoul, Korea. [in Korean]