< 훈련결과보고서 요약서 >

성 명	강 태 선	소 속	식품의약품안전처
훈 련 국	캐나다	훈련기간	2017.4.21. - 2018.4.20.
훈련기관	POS BIO-SCIENCE	보고서매수	127 매
훈련과제	부정·불량식품 안전관리분야 전문성 향상을 위한 감시기법 연구		
보고서제목	부정·불량식품 안전관리분야 전문성 향상을 위한 감시기법 연구		
내용요약	○ 부정·부량식품은 경제적인 이득을 목적으로 제작 유통되는 모든 식품유형을 말하며, 이는 소비자, 식품 업체, 정부 모두에 부정적인 영향을 미친다. 2008년 중국에서 발생한 멜라민 분유 사건, 2013년 유럽에서 발생한 말고기 미트볼 사건은 부정·불량식품이 전 세계 식품안전과 경제에 매우 심각한 영향을 미친 대표적인 사례들이다. ○ 전통적으로 식품 및 식품원료의 진위여부는 관능(모양, 색, 냄새, 질감 등) 중심으로 수행이 되었다. 하지만 가공식품의 발달은 이러한 전통적인 식품분석방법의 한계를 초래했으며, 보다 첨단의 분석법 개발을 요구하고 있는 실정이다. ○ 최근 보고된 부정·불량식품 동향 보고서에 따르면 상위 7개 기술이 부정·불량식품의 판별에 주로 이용이 되고 있다. - 상위 7개 기술: high-performance liquid chromatography, infrared spectroscopy, gas chromatography, isotope ratio mass spectrometry, hyphenated mass		

	spectroscopy, near infrared spectrometry, polymerase chain reaction ○ 하지만 식품 및 가공식품의 경우 그 사용원료가 매우 다양하고 그로 인한 수만은 종류의 중간 대사산물의 존재로 인해 크로마토그래피 및 스펙트럼 결과의 분석이 매우 복잡하고 어렵다. ○ 따라서 최근에는 생물의 고유 정보를 담고 있는 DNA를 이용한 다양한 기술들이 식품원료의 판별에 활발히 적용되어 다양한 분석법들이 개발되고 있다. - DNA 분석에 기반한 기술: DNA barcoding, forensically informative nucleotide sequencing, PCR-restriction fragment polymorphism, species-specific PCR, real-time PCR 등 ○ 이 중 실시간 유전자 분석법(real-time PCR)은 최근 가장 주목받는 기술 중 하나로, 우수한 민감도, 정확성, 특이성, 간편성 등의 장점을 기반으로 다양한 가공식품의 분석법 개발에 널리 이용되고 있다. - real-time PCR 기술: 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 증폭된 유전자 산물의 양을 실시간으로 정량할 수 있는 기술로서, 육가공품, 수산물, 유제품, 건강기능식품의 진위여부 판별에 널리 활용됨 ○ 실시간 유전자 분석법은 부정·불량식품의 판별에 광범위하게 활용되고 있으나, 실시간 유전자 분석법 기반의 식품원료 판별법 개발을 위한 '기준 및 검증방법'은 아직 확립되어 있지 않은 실정이다. ○ 따라서 본 연구에서는 보다 효율적이고 정확한 식품 및 식품원료의 진위판별을 위한 실시간 유전자 분석법 개발의 '기준 및 검증방법'에 관한 연구를 수행하였다.

	○ DNA 추출, 농도 및 순도의 측정 방법: 실시간 유전자 분석법 개발을 위해서는 식품 및 식품원료로부터 고순도의 DNA를 추출하는 과정이 첫 번째 단계이다. DNA의 추출을 위해서는 상업용 추출 키트 및 다양한 종류의 'In-house method'가 보편적으로 사용된다. ○ 일반적으로 상업용 추출 키트는 결과의 일관성, 편의성 등의 장점으로 인해 광범위하게 실시간 유전자 분석법에 이용되고있다. ○ PCR 반응 억제제를 포함하고 있는 다양한 가공식품을 대상으로 하는 실시간 유전자 분석법의 경우, 상업용 추출 키트와 분석 제품의 유형에 적합한 'In-house method'를 결합한 '하이브리드 방법'을 이용하면 추출 효율 및 순도를 증가시킬 수 있다. ○ 추출된 DNA 농도와 순도의 결과는 이후 실시간 유전자 분석법의 결과에 직접적으로 영향을 미친다. DNA의 정량 방법에는 두 가지(spectrophotometric method 및 spectrofluorometric method) 방법이 널리 사용되고 있다. ○ 'spectrophotometric method'은 가장 일반적으로 사용되는 DNA 정량 방법으로 측정 방법이 간편하고 빠르나, RNA, 단백질 등의 오염 물질에 의해 결과 값이 쉽게 영향을 받는다. 반면 'spectrofluorometric method'은 형광 염료를 사용하여 double-stranded DNA의 농도만을 특이적으로 측정할 수 있는 방법으로, 다양한 가공식품을 대상으로 하는 실시간 유전자 분석법 개발에 보다 적합할 수 있다. ○ 추출된 DNA의 순도는 'spectrophotometric method'에 의해 측정이 되며, 1.8 (260 nm/ 280 nm) 이상의 값이 실시간 유전자 분석을 위해 적합하다 판단할 수 있다. ○ 실시간 유전자 분석법 개발을 위한 목적 유전자(target

	gene)의 선택: 식품원료에 존재하는 DNA는 가공과정 동안에 작은 크기의 절편으로 분해된다. 따라서 적절한 목적 유전자의 선택은 실시간 유전자 분석법의 개발에 있어 매우 중요하다. ○ 12S rRNA, 16S rRNA, cytochrome b, cytochrome oxidase, internal transcribed spacers, displacement loop 등의 다양한 유전자 마커가 육류, 가금류, 수산물, 식물성 원료의 판별을 위해 이용된다. ○ 이러한 유전자 마커는 세포 내에 높은 복제 수로 존재하여 분석법의 감도를 증가시킬 수 있으며 다양한 가공식품의 분석에 적합하다. ○ 실시간 유전자 분석법 개발을 위한 프라이머 및 프로브의 설계: 목적 유전자를 특이적으로 증폭하기 위한 프라이머 및 프로브는 가공식품의 특성을 고려하여 150 bp 미만의 작은 크기의 증폭산물을 생성하도록 설계되며, 이는 개발된 실시간 유전자 분석법의 감도를 향상시킬 수 있다. ○ 분석의 특이성(specificity): 개발된 실시간 유전자 분석법의 특이성은 컴퓨터 프로그램 상에서 진행되는 'in silico' 분석과 다양한 비교종 및 근연종을 대상으로 실제 실험을 수행하는 'in situ' 분석으로 확인할 수 있다. ○ 'SYBR Green I' 등과 같이 형광 염료를 사용하는 실시간 유전자 분석법 개발 시, PCR 반응 종료 후 'melting curve' 분석을 수행하여 비특이적 신호의 생성 유무를 반드시 확인해야한다. ○ 표준 검량선(standard curve): 실시간 유전자 분석에서 표준 검량선은 분석방법의 효율 및 감도를 측정할 수 있는 매우 유용한 지표이다. 실시간 유전자 분석법에서 표준

검량선은 DNA의 로그 값과 측정된 'Quantification cycle (Cq)'값을 이용하여 아래와 같은 형태의 회귀방정식으로 표시된다.

$$Y = aX + b$$

(X 및 Y 는 DNA 농도 및 Cq 값을, a 및 b는 기울기와 절편을 각각 의미함)

○ 증폭효율(E): 실시간 유전자 분석법의 증폭효율은 표준 검량선의 기울기로부터 아래의 식을 이용하여 계산한다.

$$E\ (\%) = [(10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$$

○ 이론적 증폭효율은 100% (기울기 -3.32)이나 실제 부정·불량식품의 실시간 유전자 분석법 개발을 위해서는 증폭효율 90%～110% (이는 기울기 -3.6～-3.1에 해당함), 직선성 0.98 이상의 기준이 보편적으로 적용된다.

○ 검출한계(LOD): 검출한계는 실시간 유전자 분석법의 감도를 나타낸다. 시료(analyte) 중에 존재하는 분석 대상 DNA의 검출 가능한 최소량 또는 최소 농도를 의미하며, 반복실험에서 95% 이상 양성 결과를 얻을 수 있는 DNA의 최소 농도(copies, g/DNA, % 등)를 의미한다(즉 위음성률 5% 미만).

○ 정량한계(LOQ): 정량한계는 실시간 유전자 정량분석법 개발을 위해 필요한 조건이다. 정량한계는 적정범위의 정확도 및 정밀도를 유지하며 정량할 수 있는 시료의 최소 농도를 의미한다. 일반적 부정·불량식품 분석에 있어 25%～30% 이내의 정확성 및 정밀성이 요구된다.

- 정확성 및 정밀성: 최소 농도에서 얻은 측정값(copies, g of DNA, % 농도 등)의 상대표준편차(RSD 또는 coefficient of variation) 값으로 측정

	○ 실시간 유전자 정량분석법에서 사용되는 정량법: 실시간 유전자 정량분석법 개발을 위해서는 보편적으로 3가지 방법이 사용된다. ○ 첫 번째 방법: 분석 시료에서 목적 DNA의 농도는 측정된 Cq 값을 표준 검량선(standard curve)에 대입하여 아래의 식을 이용하여 간단히 계산할 수 있다. $$\text{DNA 농도} = 10^{[(Cq-b)/a]}$$ (a 및 b는 표준 검량선의 기울기와 절편을 각각 의미함) ○ 첫 번째 방법은 손쉽게 시료에 있는 목적 DNA의 농도를 구할 수 있는 반면, 표준 검량선에 사용된 매트릭스와 분석 시료의 매트릭스가 다를 경우 편향된 결과를 가져올 수 있다. ○ 두 번째 방법에서는 분석할 시료와 동일한 매트릭스와 가공과정을 거친 표준 시료(matrix-adapted standards)를 대상으로 작성한 표준 검량선을 이용하여 첫 번째 방법과 동일한 식을 이용하여 목적 유전자의 농도를 계산한다. ○ 두 번째 방법은 유전자 추출방법 및 사용기기에 상관없이 보다 높은 정확도 및 정밀성을 나타낼 수 있다, 하지만 다양한 종류의 시료를 분석하기 위해서는 그만큼의 표준 시료를 제작사여 검량선을 각각 만들어야 하는 단점이 있다. ○ 세 번째 방법에서는 표준 유전자(reference gene)를 사용하여 실시간 유전자 분석 결과 값을 보정(normalization)한다. 이러한 보정 단계는 식품에 사용될 수 있는 다양한 원료의 DNA 검출 및 측정에서 오는 오차를 줄여줄 수 있다.

	○ 실시간 유전자 분석 결과의 값은 크게 세 가지 방법으로 보정될 수 있다. ○ 첫 번째 보정방법에서는 'single-copy myostatin'이 표준 유전자(reference gene)로 사용되며 목적 유전자(target gene) 검량선 및 표준 유전자 검량선 두 개의 표준 검량선이 이용된다. ○ 혼합 및 가공식품에 들어있는 특정 원료의 농도는 아래와 같이 실시간 유전자 분석 결과 값을 보정하여 계산할 수 있다. 특정 원료 농도(%) = 특정 원료 DNA 농도 / 제품에 포함된 전체 DNA 농도 ○ 첫 번째 보정방법에서는 'single copy'의 목적 유전자 및 표준 유전자를 사용하여 분석의 감도가 떨어질 수 있다. ○ 두 번째 보정방법에서는 'multicopy'의 목적 유전자 및 표준 유전자를 사용하여 분석의 감도를 향상시켰다. - multicopy 표준 및 목적 유전자: 18s rRNA, 12s rRNA, D-loop, cytochrome b 등의 유전자가 널리 이용된다. ○ 실시간 유전자 분석 결과 값을 아래의 식을 이용해서 보정한다. CqSPS = CqEU × CqSP / CqEUS - CqSPS: 보정된 Cq 값 - CqEU: 표준 시료의 표준 유전자 분석을 통해 얻은 평균 Cq 값 - CqSP: 분석 시료의 목적 유전자 분석을 통해 얻은 Cq 값 - CqEUS: 분석 시료의 표준 유전자 분석을 통해 얻은 Cq 값

○ 세 번째 보정방법의 두 번째 방법과 유사하나 아래와 같은 보정식을 사용한다.

$$\triangle Cq = Cq_{target} - Cq_{reference}$$

- $\triangle Cq$: 보정된 Cq 값
- Cq_{target}: 분석 시료의 목적 유전자 분석을 통해 얻은 Cq 값
- $Cq_{reference}$: 분석 시료의 표준 유전자 분석을 통해 얻은 Cq 값

○ 실시간 유전자 정량분석법을 위한 상기의 보정방법을 사용하기 위해서는 목적 유전자와 표준 유전자의 증폭효율이 동일수준임을 확인해야한다.

○ 실시간 유전자 정량분석법의 진실도(trueness): 진실도는 정확도(accuracy)로 알려져 있으며 참값과 측정값 사이의 일치 정도를 의미한다.
- 진실도는 정성실험에 적용되지 않는다.

○ 실시간 유전자 정량분석법에서 진실도는 아래의 식을 사용하여 '바이어스(bias)'값으로 표시된다.

$$\text{진식도(\%)} = [(\text{측정값} - \text{참값}) / \text{참값}] \times 100$$

○ 부정·불량식품 분석을 위한 실시간 유전자 정량분석법에서는 일반적으로 25~30% 범의 내의 값이 요구된다.

○ 실시간 유전자 정량분석법의 정밀도(precision): 균질한 검체를 여러 번 채취하여 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접한 정도를 의미한다.

○ 정밀도는 실험실 내 차이(intra-laboratory variation)를 나타내는 반복성(repeatability)과 실험실 간 차이

	(inter-laboratory variation)를 나타내는 재현성 (reproducability)으로 세분화 될 수 있다. - 본 보고서에서는 반복성을 주로 고찰함. ○ 실시간 유전자 분석법의 반복성은 반복성 실험을 통해 얻은 측정값들의 일치정도를 의미한다. - 반복성 실험: 동일한 실험실, 실험자, 장치와 기구, 시약, 기타 동일한 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 복수의 시료를 짧은 시간차로 분석하는 실험을 의미한다. - 반복성은 정성실험에 적용되지 않는다. ○ 반복성은 아래의 식을 사용하여 '상대표준편자(RSD)'값으로 표시된다. 반복성(%) = (측정값의 표준편차 / 측정값의 평균) × 100 ○ 부정·불량식품 분석을 위한 실시간 유전자 정량분석법에서는 일반적으로 25% 범의 내의 값이 요구된다. ○ 실시간 유전자 분석법의 완건성(robustness): 완건성은 실시간 유전자 분석법(정량 및 정성)의 검증을 위해 필요한 요소이나 부정·불량식품 분석을 위한 기준은 설정되어있지 않다. ○ 일반적으로 부정·불량식품의 실시간 유전자 분석법 개발을 위해서는 아래와 같은 요소들이 분석법의 완건성을 검정하기 위해 평가된다. - 두 개 이상의 유전자 추출 방법 사용 및 결과 비교 - 두 개 이상의 real-time PCR 기기 사용 및 결과 비교 - 두 개 이상의 분석 시약(real-time PCR master mix) 사용 및 결과 비교 - 어닐링 온도 조건 변경(±1℃) 및 결과 비교 - PCR reaction volume 변경(±5%) 및 결과 비교

	○ 식품가공기술의 발달과 자유무역 등의 확대로 인해 다양한 유형의 식품이 유통되고 있는 실정이다. 이러한 제품들의 진위여부는 기존의 분석 방법만으로는 판별하기 어려운 실정이다. ○ 특히 가공식품은 그 제조과정의 특성상 비의도적인 혼입이 발생할 수 있다. 하지만 기존의 분석법은 비의도적 또는 의도적 혼입을 판별할 없는 한계를 보였다. 실시간 유전자 분석법은 가공식품의 진위여부를 정량적으로 판별할 수 있는 장점을 가지고 있어 현재 널리 활용되고 있다. ○ 따라서 본 연구에서 수행한 '실시간 유전자 분석법 개발을 위한 기준 및 검증'연구는 다양한 식품 및 식품원료의 진위여부를 과학적으로 판별할 수 있는 분석법 개발 및 부정·불량식품 안전관리 전문성향상에 크게 기여할 것으로 사료된다. ○ 또한 본 연구결과는 식품 및 식품원료의 '기준 및 규격' 등의 정책 설정에 중요한 기초자료로 활용될 수 있어 '안전한 먹을거리 환경 조성'에 크게 기여할 것으로 사료된다.