KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 38, No. 5, pp. 605~608 (2006)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

PCR에 의한 수입식품의 유전자재조합 원료 분석 및 모니터링

김희연* · 박용춘 · 노혜림 · 조준일 · 김은정 · 남혜선
이진경 · 이진하 · 강윤숙[1] · 이종옥[2]
경인지방식품의약품안전청 시험분석팀, 식품의약품안전청 [1]식품미생물팀, 식품의약품안전청 [2]식품오염물질팀

Monitoring and Analysis of Genetically Modified Ingredients of Imported Foods by PCR

Hee-Yun Kim*, Yong-Chjun Park, Hye-Lim Ro, Jun-IL Jo, Eun-Jung Kim, Hae-Sun Nam, Jin-Kyung Lee, Jin-Ha Lee, Yoon-Sook Kang[1], and Jong-Ook Lee[2]
Testing and Analysis Team Gyeongin Regional KFDA,
[1]Food Microbiology Team, KFDA,
[2]Food Contaminants Team, KFDA

Abstract Genetically modified (GM) ingredients found in imported raw materials and processed foods were monitored in the province Gyeongin in Korea. The analysis was performed according to "Testing methods for genetically modified foods of food standards and specifications" established in Korea. We received 120 items from the Gyeongin Regional KFDA. Only two of the 120 items analyzed in the samples, were contaminated with GM ingredients. However, we could not analyze the internal standard gene from 12 processed foods. We found that the extracted total DNA of the above 12 samples were extracted and found to be degraded. The total DNA contained a very small fragment of less than 300 base pair. Therefore, it seems that the total DNA is not large enough to serve as the template DNA for PCR analysis.

Key words: genetically modified ingredient, contamination, imported foods, monitoring, PCR

서 론

최근 생물공학기술의 발달에 따른 제초제 내성 또는 병충해 저항성 콩, 옥수수, 면화 등 다양한 유전자재조합 농산물이 개발되고 있으며, 개발된 농산물은 전 세계적으로 생산 및 유통되고 있다(1-5). 유전자재조합식품은 유전자재조합 기술을 응용하여 개발된 농산물에서 유래한 식품을 말한다. 우리나라에서는 유전자재조합식품의 안전성평가를 통하여 심사 완료된 제품에 한하여 시중에 유통 중이다(6,7). 국내의 경우 "유전자재조합식품·식품첨가물 안전성평가자료심사지침"(7)에 의거하여 2005년 현재 30종이 안전성심사가 완료된 상태(콩 1종, 옥수수 16종, 감자 4종, 면화 6종, 캐놀라 3종)이며, 9종이 진행중(면화 3종, 옥수수 2종, 캐놀라 3종, 사탕무우 1종)에 있다. 식품위생법 개정에 따라서 2005. 2. 27부터 유전자재조합식품의 심사가 의무화되면서 심사 완료되지 않는 품목에 대하여는 시중 유통이 금지된다. 그리고 2001년 7월 13일부터 "유전자재조합식품등의 표시기준"이 의무화되면서 표시제도(8,9)가 마련되어 시행되고 있어서 유전자재조합원료의 비의도적 혼입량이 3% 이상이면 표시를 의무화하고 있으며, 일본 5%, 태국 1%, 유럽연합 0.9% 등 각 국가별로 비의도적 혼입량에 대한 기준치가 다르게 설정되어 운영되고 있다. 따라서 표시기준이 올바로 시행되고 있는지를 확인하기 위한 과학적 분석방법이 요구되고 있다.

이에 식품의약품안전청에서는 분석방법을 확립하여 식품의약품안전청 고시 제 2005-3호('05. 02)로 식품의 기준 및 규격중 개정을 통하여 식품공전 제 7. 일반시험법 23. 유전자재조합식품의 시험법을 마련하였다(10). 이러한 시점에서 수입식품 또는 국내 유통되는 식품에 대한 모니터링을 통하여 국내에서 안전성 심사가 완료된 품종만이 사용되고 있는지 그 여부 및 표시제 이행실태를 확인하는 것이 주요 현안 과제로 대두되고 있다. 본 연구에서는 2004년 9월부터 12월까지 경인지역(의왕검사소, 인천공항검사소, 평택항수입식품임시검사소 포함)으로 수입되는 원곡 및 가공식품을 대상으로 정밀검사 또는 부작위 샘플링 시료 총 120건의 분석을 실시함으로써 유전자재조합원료 사용 현황 및 표시제 이행실태를 파악하고자하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에서는 2004년 9월부터 12월까지 경인지역으로 수입되는 검체를 대상으로 하였으며, 주원료에 따라서 콩류, 옥수수류 및 콩/옥수수류 혼합제품으로 구분하였으며, 가공공정의 정도에 따라 원료농산물, 원료농산물 분쇄 등 단순 가공의 경우는 반가공품, 기타의 경우는 가공식품으로 구분하였다. 검체는 콩류(원료농산물 27종, 반가공식품 3종, 가공식품 34종) 64종, 옥수수류(원료농산물 1종, 반가공품 31종, 가공식품 20종) 52종, 콩 및 옥수수 혼합 가공식품 4종 등 총 120건에 대한 분석을 실시하였다.

*Corresponding author: Hee-Yun Kim,Testing and Analysis Team, Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administration, Incheon, 402-835, Korea
Tel: 82-32-450-3360
Fax: 82-32-442-4622
E-mail: pmheekim@kfda.go.kr
Received January 24, 2006; accepted October 11, 2006

분석방법

기본적인 방법은 유전자재조합식품분석지침(2002. 6.)에 따랐으며, 간단히 요약하면 아래와 같다(10).

시료의 전처리

곡류·두류 등 원료농산물의 경우 최소한 3,000립 또는 1 kg 이상을 취하여 분쇄기(DA505-2, Daesungatron, Seoul, Korea)로 균질하게 분쇄한 것을 분석시료로 사용하였다. 이때 검정결과에 영향을 미칠 수 있는 원료농산물의 경우 1% sodium dodecyl sulfate (Sigma Co., St. Louise, MO, USA)용액에서 세정하여 건조 후 사용하였다. 수분함량이 높은 시료는 원심분리하여 얻은 고형분 또는 55°C 건조기에서 하룻밤 방치하거나 동결건조기를 이용하여 수분을 증발시켜 남은 고형분을 분쇄기를 이용하여 균질하게 분쇄한 것을 분석시료로 사용하였다. 당분 함량이 높은 검체는 증류수를 이용하여 당분을 녹이고 3회 이상 원심 분리한 후 고형분을 취하여 분석시료로 사용하였다.

유전자 추출 및 확인

유전자의 추출은 QIAGEN Plant Maxi kit(Qiagen, Hilden, Germany) 또는 QIAGEN Plant Mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였으며 기본적인 방법은 제조사의 방법에 준하여 실험하였고, 마지막 단계에서 건조된 침전물은 50 μL의 TE 완충액(pH 8.0)을 가한 후 4°C에서 12~24시간 정치하면서 완전히 녹여 이를 DNA 시료 원액으로 사용하였다. 추출된 유전자는 분광측정기(Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences, Cambridge, England)를 사용하여 추출량 및 순도를 확인한 후 polymerase chain reaction(PCR)을 위한 주형유전자로 사용하였다.

Table 1. The primers used in this study

Target materials	Primer set	Predicted size
Soybean	Le1n02-5'/Le1n02-3'[1)]	118 bp
	RRS 01-5'/RRS 01-3'[2)]	121 bp
Maize	SSIIb 1-5'/SSIIb 1-3'[1)]	151 bp
	Bt11 3-5'/Bt11 3-3'[2)]	127 bp
	GA21 3-5'/GA21 3-3'[2)]	133 bp
	T25 1-5'/T25 1-3'[2)]	149 bp
	Bt176 2-5'/Bt176 2-3'[2)]	100 bp
	M810 2-5'/M810 2-3'[2)]	113 bp
Soybean & Maize	P35S1-5'/P35S1-3'[3)]	101 bp
	NOS ter 2-5'/NOS ter 2-3'[3)]	151 bp

[1)]Internal standard gene.
[2)]Structural gene.
[3)]Screening gene

PCR 조건 및 전기영동

본 연구에서는 일본 Nippon gene사(Toyama, Japan)에서 제공하는 primer와 TaKaRa Tag™ polymerase(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 PCR(GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, CA, USA)을 실시하였다. 내재성유전자로 사용된 부위 중 콩은 lectin 유전자, 옥수수는 SSIIb(starch synthase) 유전자를 이용하였다(11,12). 선별을 위한 유전자로는 35S 프로모터 및 NOS 터미네이터를 이용하였으며, 도입된 구조유전자로 콩은 RRS, 옥수수의 경우 Bt11, GA21, T25, E176, MON810를 사용하였다(13-16)(Table 1). PCR을 위한 반응액의 조건은 Table 2에 명시되어 있으며, PCR 조건은 95°C에서 10분간 방치하여 최초의 변성이 일어나게 한 후, 95°C에서 30초간 변성, 60°C에서 30초간 결합, 72°C에서 30초간 신장 하는 것을 40회 반응시켰다. 이후 72°C에서 7분간 신장을 하고, 종료되면 4°C를 유지하도록 설정하였다. PCR 산물의 확인여부는 1.5% agarose 젤(LO3, Kyoto, TAKARA, Japan)에 전기영동후 ethidium bromide(Sigma-Aldrich, Buchs, Germany)로 염색 후 밴드의 유무를 확인하였다.

결과 및 고찰

식품형태에 따른 분리 genomic DNA의 size pattern

추출된 유전자의 순도(O.D.260/O.D.280)는 0.90-2.10, 추출농도는 25-2,080 μg/mL로 시료별로 매우 다양하게 추출되었다. 그리고 원료농산물 및 반가공식품의 경우 추출된 유전자는 20 kbp 이상 크기가 추출되었지만 이에 비하여 가공식품의 추출된 유전자는 500 bp 이하로 비교적 작은 크기로 나타나는 양상(Fig. 1)을 확인 할 수 있었다.

추출유전자의 PCR 주형으로의 효율성 분석

추출된 유전자의 크기가 소형이거나, 추출량이 다량일지라도 콩 또는 옥수수로부터 유래한 유전자의 양이 극미량일 경우에는 PCR을 위한 주형유전자로의 사용이 불가능하다. 따라서 시료로부터 추출된 유전자가 PCR의 주형유전자로 사용 될 수 있는지 그 가능성을 확인하기 위하여 내재성유전자 확인을 위한 PCR을 실시하였다. 콩류의 경우 *lec* 유전자, 옥수수류의 경우 starch synthase를 암호화하는 *ssIIb* 유전자, 콩/옥수수를 함유하는 경우에는 *lec* 유전자 및 *ssIIb* 유전자를 각각의 내재성유전자(11,13)로 PCR을 수행하였다. 이로부터 각각의 *lec* 유전자가 118 bp, *ssIIb* 유전자가 151 bp가 되는 PCR 산물 생성 유무를 확인하였다. 내재성 유전자의 PCR 산물이 확인되지 않을 경우에는 시료로부터 유전자를 재 추출하여 PCR을 1회 추가로 실시하였다. 그 결과 콩류 3건, 옥수수류 8건 및 콩/옥수수혼합제품 1건 등 총 12건(10%)에서는 내재성유전자를 확인 할 수 없어 검사불능으로 판정하였다. 내재성 유전자가 확인된 경우에 한하여 cauliflower

Table 2. Composition of PCR reaction solution

Components	Stock solution	Final concentration	Volume (μL/reaction)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
Buffer	10 ×	1 ×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2
Primers	25 μM, each	0.5 μM (each)	0.5
Template DNA	20 ng/μL	50 ng	2.5
DW		Added to make the final volume of 25 μL	15.875
Total volume			25

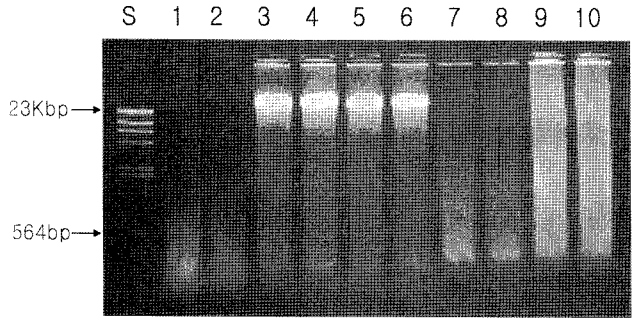

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of extracted total DNA. Lane S: λ-HindIII, 1, 2: processed foods, 3-6: raw materials, 7-10: semi-processed raw materials.

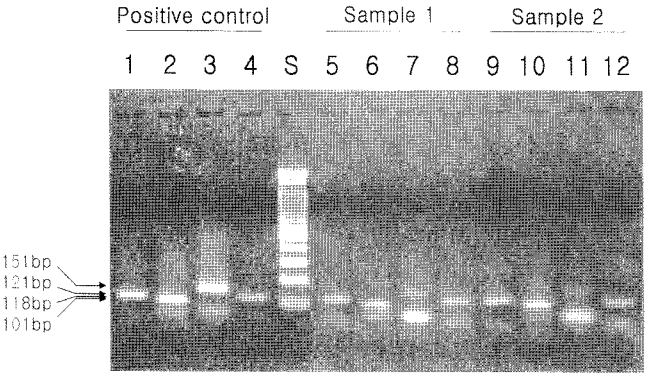

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products using lectin, 35S promoter, NOS terminator and RRS primer for detection of soy. Lane S: 100 bp ladder, 1, 5, and 9: lectin primer, 2, 6, and 10: 35S promoter primer, 3, 7, and 11: NOS terminator primer, 4, 8, and 12: RRS.

mosaic virus로부터 유래한 35S 프로모터 및 *Agrobacterium tumefaciens*로부터 유래한 NOS 테미네이터를 이용하여 유전자재조합 원료가 함유되어있는지를 선별하기위한 2차 PCR을 실시하였다(11,17-19). 콩류의 경우 35S 프로모터 및 NOS 터미네이터가 검출되면 최종적으로 3차 PCR을 수행하여 RRS 유전자가 확인된

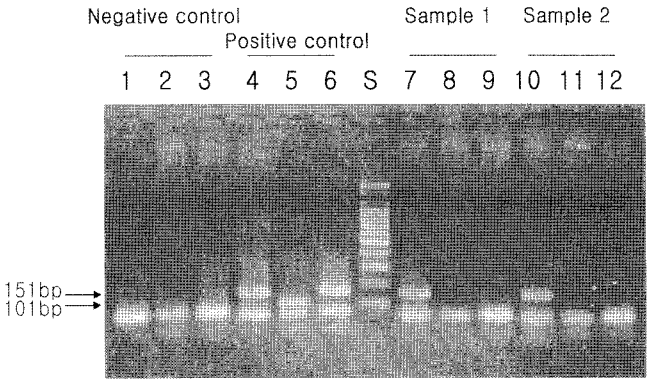

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products using SSIIb, 35S promoter and NOS terminator primer for detection of maize. Theses samples were not detected PCR product of 35S promoter gene (101 bp) and NOS terminator gene (151bp) for first screening of genetically modified ingredients. Lane S: 100 bp ladder, 1, 4, 7, and 10: SSIIb primer, 2, 5, 8, and 11: 35S promoter primer, 3, 6, 9, and 12: NOS terminator primer.

경우에 한하여 검출로 판정하였다(20). 옥수수류의 경우 35S 프로모터 또는 NOS 터미네이터가 검출된 시료에 한하여 3차 PCR을 수행하였으며, 구조유전자(Bt11, GA21, T25, E176, MON810)의 검출이 확인된 경우에 한하여 최종적으로 검출로 판정하였다(13,14,16,21). 판정시 유전자재조합식품검사지침(9)에 의한 판정표에 의거하여 최종판정을 실시하였다.

분석시료의 GMO ingredient 함유 분석

유전자재조합원료를 사용한 제품은 콩류(원료농산물 27종, 반가공식품 3종, 가공식품 34종) 64종 중 가공식품 1건(Fig. 2), 콩 및 옥수수 혼합 가공식품 4종 중 1건 등 총 2건에서 검출되어 1.7%의 검출율을 나타내었다(Table 3). 검출된 제품 2건은 모두 유전자재조합 콩인 RRS(round-ready soybean)가 함유된 것으로 확인되었다. 가공식품의 경우 정량분석법이 적용되지 않아 정량분석을 실시하지 않았으며, 관할구청에 확인해본 결과 해당제품은 구분유통증명서를 구비하고 있음을 확인하였다. 그러나 옥수수류(원료농산물 1종, 반가공식품 31종, 가공식품 20종)에서는 유전자

Table 3. Analysis of genetically modified ingredients from imported foods in Gyeongin province from september to December of 2004

Sample	Processed condition	Results			
		Subtotal	Detected	Not detected	Not analysed
Soybean	Raw materials	27	0	27	0
	Semi-processed food	3	0	3	0
	Processed foods	34	1	30	3
	Subtotal	64	1	60	3
Maize	Raw materials	1	0	1	0
	Semi-processed food	31	0	31	0
	Processed foods	20	0	12	8
	Subtotal	52	0	44	8
Soybean and maize	Raw materials	0	0	0	0
	Semi-processed food	0	0	0	0
	Processed foods	4	1[1)]	2	1
	Subtotal	4	1	2	1
	Total	120	2	106	12

[1)]Detected sample: processed food containing isolated soy protein (2.88%), corn starch (46.95%) and others.

재조합원료를 사용한 제품은 확인 할 수 없었다(Fig. 3). 검사불능으로 판정된 시료 12건은 옥수수전분을 사용한 제품이 9건 이였으며, 콩을 주원료로 사용한 가공식품이 3건(소스류 1건, 콩류가공품 1건 및 기타가공품 1건)으로 나타났다. 검사불능 시료에 대한 원인을 분석한 결과 옥수수 전분의 경우 침지, 정제 등의 제조과정에서 대부분의 유전자가 소실되거나 분해되어 최종 제품에는 옥수수 전분에서 유래한 유전자가 극미량 존재하여 분석이 불가능한 것으로 추측된다. 그리고 소스류 1건, 콩류가공품 1건, 기타가공식품 1건의 경우 최종제품에 콩으로부터 유래된 유전자가 극미량 존재하거나, 유전자가 추출되어도 매우 작은 크기로 존재하고 있기 때문에 PCR을 위한 주형유전자로는 용이하지 않기 때문인 것으로 추측된다.

요 약

2004년 9월부터 12월까지 경인지역으로 수입되는 원료농산물 및 가공식품에 대하여 유전자재조합성분 함유여부 및 유전자재조합식품 표시제 이행실태를 확인하기 위하여 모니터링을 실시하였다. 분석방법은 유전자재조합식품 검사지침에 따랐으며, 콩류가공품(원료콩 포함) 64건, 옥수수 가공품(원료 옥수수 포함) 52건, 콩 및 옥수수 함유식품 4건 등 총 120건을 분석대상으로 하였다. 분석결과 콩을 원료로 하는 콩류가공품 1건, 콩 및 옥수수 혼합 가공식품 1건 등 총 2건에서 유전자재조합 콩인 round-ready soybean 성분을 확인 할 수 있었다. 그러나 유전자재조합 옥수수(Bt11, GA21, T25, E176, Mon810)를 포함하는 가공식품은 확인되지 않았다. 그리고 콩 가공품 3건, 옥수수가공품 8건, 콩 및 옥수수가공품 1건 등 총 12건에서는 내재성유전자를 확인할 수 없어 검사불능으로 판정되었다. 유전자재조합성분이 확인된 시료 2건은 구분유통증명서를 구비하고 있었으며, 검사불능 시료의 경우 대부분 옥수수전분을 포함하는 제품으로 확인되었고, 추출된 유전자를 양상을 분석한 결과 크기가 300 bp 이하로 절단되어 PCR법을 이용한 분석 시 주형유전자로 사용하기에는 충분하지 않은 것으로 판단된다.

문 헌

1. Dunwel JM. Novel food products from genetically modified crop plants: method and future prospects. Int. J. Food Sci. Technol. 33: 205-213 (1998)
2. Dunwell JM. Transgenic crops: the next generation, or an example of 2020 vision. Ann. Bot. 84: 269-277 (1999)
3. Grasser CS, Fraley RT. Genetically engineering plants for crop improvement. Science 244: 1293-1299 (1998)
4. KFDA. What is the GM Foods? Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 8-12. (2001)
5. KFDA. GM Foods and Safety Management. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 14-16. (2002)
6. KFDA. Revision of standard and specification of foods, KFDA's Notification No. 2005-3. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea (2005)
7. KFDA. Guidelines regarding review of safety assessment data for genetically modified foods and food additives, KFDA's Notification No.1999-46. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea (1999)
8. KFDA. Standard and Specification of GM Foods Labeling, KFDA's Notification No 2000-43. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea (2000)
9. KFDA. Revision of Standard and specification of GM foods labeling, KFDA's Notification No 2001-43. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea (2001)
10. KFDA. Guideline for Detection Method of GM Foods. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 7-13. (2002)
11. Meyer R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMO's in food. Food Control 10: 391-399 (1999)
12. Heo MS, Kim JH, Park SH, Woo GJ, Kim HY. Detection of genetically modified maize safety-approved in korea using PCR. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 1033-1038 (2003)
13. Markus L, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. J. AOAC Int. 82: 923-928 (1999)
14. Matsuoka T, Kawashima Y, Akiyama H, Hiura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. J. Food Hyg. Soc. Japan 41: 137-143 (2000)
15. Matsuoka T, Kawashima Y, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Sebata T, Isshiki K, Toyoda M, Hino A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. J. Food Hyg. Soc. Japan 40: 149-157 (1999)
16. Matuoka T, Kuribara H, Takubo K, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). J. Agric. Food Chem. 50: 2100-2109 (2002)
17. Wurz A, Bluth A, Zeltz P, Pfeifer C, Willmund R. Quantitative analysis of genetically modified organism (GMO) in processed food by PCR-based methods. Food Control 10: 385-389 (1999)
18. Rolf M. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in foods. Food Control 10: 391-399 (1999)
19. Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, Kroath H. Genetically modified organism in food-screeing and specific detection by polymerase chain reaction. J. Agric. Food Chem. 47: 5038-5043 (1999)
20. Kim HJ, Park SH, Kim HY. Study for detection of glyphosate tolerant soybean using PCR. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 521-524 (2001)
21. Heo MS, Kim JH, Park SH, Woo GJ, Kim HY. Detection of genetically modified maize safety-approved in Korea using PCR. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 1033-1038(2003)