

발간등록번호

11-1543000-001415-01

분쇄 및 혼합육제품의 원료육 정성, 정량 분석
평가 기술 및 종식별 KIT 개발
최종보고서

2016. 11. 01.

주관연구기관 / 경상대학교 학교기업 GAST
협동연구기관 / 경상대학교

농림축산식품부

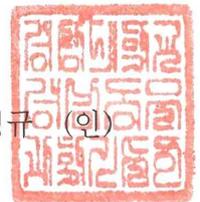
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “분쇄 및 혼합육제품의 원료육 정성, 정량 분석 평가 기술 및 종식별 KIT 개발”(개발기간 : 2013. 07. 16 ~ 2016. 07. 15)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 07. 15.

주관연구기관명 : 경상대학교 학교기업 GAST (대표자) 이정규 (인)



협동연구기관명 : 경상대학교 산학협력단 (대표자) 정종일 (인)



주관연구책임자 : 임현태

협동연구책임자 : 양한술

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	113027-3	해 당 단 계 연구 기 간	3년	단 계 구 분	(1단계)/ (1단계)
연구 사업명	중 사업명	고부가가치식품기술개발			
	세부 사업명	식품기술			
연구 과제명	대 과제명	분쇄 및 혼합육제품의 원료육 정성, 정량 분석 평가 기술 및 종식별 KIT 개발			
	세부 과제명	<ul style="list-style-type: none"> - 제1세부 : 분쇄 및 혼합육제품 성분에 대한 과학적 분석을 통한 정성, 정량분석 KIT 개발 - 제1협동 : 분쇄 및 혼합육제품 내 원료육의 단백질 성성 및 정량 분석 평가 기술 개발 			
연구 책임자	임현대	해당단계 참여 연구원 수	총: 10명 내부: 10명 외부: 0명	해당단계 연구 개발비	정부:170,000천원 민간:56,700천원 계:226,700천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 40명 내부: 40명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:510,000천원 민간:170,100천원 계:680,100천원
연구기관명 및 소속부서명	경상대학교 학교기업 GAST 유전진단사업부			참여기업명	
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	
<ul style="list-style-type: none"> - 축육별 신선육의 단백질 분석을 통해 종 특이적 단백질 탐색. - 비육단백질(non-meat protein)의 특이 단백질 탐색 및 가열처리 한 축육별 원료육의 단백질 분석과 가열에 따른 종 특이 단백질의 변이 선별. - 분쇄 및 혼합육제품을 제조하여 단백질 변이 및 정성 확인. - 질량분석을 통해 제품 내 축육별 종 특이 단백질과 비육단백질 정량분석 최적화 적립. - 육제품의 품질설정을 위해 최종제품의 원료육 및 함량 분석 가능한 기술개발. - 육제품에 사용된 원료육의 축종별 mtDNA 염기서열분석을 통한 DNA 분석 시스템 개발. - DNA 분석법을 이용한 정량, 정성적 육제품 원료육 감별 시스템 개발. 				보고서 면수 82 페이지	

국문 요약문

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>▶ 분쇄 및 혼합육제품의 원료육 정성, 정량 분석 평가 기술 및 종식별 KIT 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 축육별 신선육의 단백질 분석을 통해 종 특이적 단백질 탐색. - 비육단백질(non-meat protein)의 특이 단백질 탐색 및 가열처리한 축육별 원료육의 단백질 분석과 가열에 따른 종 특이 단백질의 변이 선별. - 분쇄 및 혼합육제품을 제조하여 단백질 변이 및 정성 확인. - 질량분석을 통해 제품 내 축육별 종 특이 단백질과 비육단백질 정량분석 최적화 적립. - 육제품의 품질설정을 위해 최종제품의 원료육 및 함량 분석이 가능한 기술개발. - 육제품의 품질설정을 위해 최종제품의 원료육 및 함량 분석 가능한 기술개발. - 육제품에 사용된 원료육의 축종별 mtDNA 염기서열분석을 통한 DNA 분석 시스템 개발. - DNA 분석법을 이용한 정량, 정성적 육제품 원료육 감별 시스템 개발. 		
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ Myosin, Troponin I, Tropomyosin, 및 Troponin T 등의 근원섬유단백질과 carbonic anhydrase 3의 근장단백질은 혼합 및 분쇄육제품의 원료육인 축종(소, 돼지, 닭, 오리)간에 종 특이 단백질로 탐색. ○ 육가공제품에 비육단백질로 이용되는 대두, 유청, 난백 및 어육단백질은 식육단백질에서는 발견되지 않는 전혀 다른 단백질들이 발현되었으며, 질량분석을 통해 Bovine albumin serum, Pas-6 and Pas-7 protein 및 Ovalbumin을 확인. ○ 주요 4종(소, 돼지, 닭, 오리)의 가열처리(70℃, 30분) 단백질 분석 결과 근장단백질의 Glucose-6-phosphate isomerase, l-lactate dehydrogenase, Carbonic anhydrase 등이 축종별로 상이한 분포 패턴을 나타내어 가열육 상태에서 축종을 구분하는 마커로 활용이 가능. ○ 분쇄 및 혼합 등 제조공정을 통해 축육 및 비육단백질 내 특이 단백질이 변성되지 않고 제조과정 이전의 상태와 동일한 단백질이 나타나며 질량분석을 통해 정성 확인이 가능. ○ 분쇄 및 혼합육제품 내 원료육 정량 평가를 위한 분석법 기술개발 및 현장적용 가능성 확인. ○ 종 특이 단백질에 대해 1차원 전기영동, 이미지분석 및 질량분석을 통해 원료육의 정성 평가와 종 특이 단백질 밀도를 활용하여 표준정량선을 유도함으로써 정량 평가를 바탕으로 축육 및 비육단백질 식별 분석 기술 개발. ○ Multiplex PCR 법을 이용한 원료육 판별 시스템 구축. <ul style="list-style-type: none"> - 최종적으로 소(Bos taurus 7F-7R primer, 667 bp), 돼지(Sus scrofa 11F-5R primer, 249 bp), 닭(Gallus 2F-4R primer, 721 bp), 오리(Anas 2F-1R primer, 546(564) bp)를 종 특이적 primer로 선정 후 분쇄육(햄, 소시지, 돈까스, 패티 등)에서 DNA를 추출하여 multiplex PCR의 조건을 확립하여 분쇄육 판별 및 종 식별을 위한 마커로 활용. 		

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시판 혼합 육제품에 대한 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 시판 중인 52종의 혼합 육제품을 대상으로 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템을 검증한 결과 5개의 제품에서 성분표와 다른 분석 결과를 도출 - 5개의 제품 중 1개의 제품에서 재 검증을 위해 새롭게 구입한 제품에서 처음 구매했을 때와 비교하여 제품 포장에 표기된 성분표의 디자인과 내용이 바뀐 것을 확인 - 바뀐 성분표의 결과가 본 연구팀에서 개발한 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템 결과와 동일한 내용으로 표기 - 따라서 본 연구팀에서 개발한 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템의 판별정확도를 검증함. ○ Real-Time PCR 법을 이용한 원료육 판별 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - Real-time PCR을 이용한 혼합 육제품의 정량 및 정성 분석을 위한 standard curve 설정 - 시판 중인 52종의 혼합 육제품을 대상으로 Real-Time PCR 법을 이용한 원료육 판별 시스템을 검증한 결과 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템 결과와 동일한 결과 도출 - 육제품 내 원료육 정량 분석을 위해 상대정량 분석을 실시 결과 대부분의 육제품에서 표기된 성분표 기술된 함량과 일치하는 결과를 도출 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정확한 육제품의 성분 분석을 통해 육제품 시장의 경쟁력을 높일 수 있고, 이를 통해 육제품 생산업체의 고급 육제품 생산을 유도 가능. ○ 개발된 분석 기술의 특허 출원을 통한 산업지적재산권확보 가능. ○ 산업지적재산권확보를 통한 바이오 관련 산업체 등 기술이전 가능. ○ 과학적 검증을 통한 육제품 원료육 검증으로 국내 축산농가 수익 보장. ○ DNA 분석을 위해 수입되는 분석제품 또는 시스템에 대한 수입대체효과. ○ 과학적 검증을 통한 안전한 먹거리 제공으로 국민 신뢰도 향상에 기여. 				
중심어 (5개 이내)	육제품	정량분석	정성분석	DNA	PCR

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>▶ <u>Development of qualitative and quantitative technologies for analyzing raw meat in ground- and mixed-meat products, and development of species-identifying KITs</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Exploration of species-specific proteins in fresh meats by livestock type. - Exploration of species-specific proteins among non-meat proteins; analyses of proteins in heat-treated raw meats by livestock type; identification of variations in species-specific proteins following heating. - Manufacture of ground- and mixed-meat products to identify protein variations and qualitative changes. - Use of mass spectrometry for optimizing quantitative analyses of species-specific proteins and non-meat proteins in meat products by livestock type. - Development of technologies that enable the analysis of raw meats and contents in final products, for meat product quality setting. - Development of technologies for analyzing raw meats and contents in final products, for setting meat product quality standards. - Development of systems for analyzing mtDNA base sequences according to livestock species used in meat products. - Development of DNA analysis methods for quantitative and qualitative discrimination of raw meat types. 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Explore myofibril proteins such as myosins, troponin I, tropomyosin, and troponin T, and the sarcoplasmic protein carbonic anhydrase 3 as species-specific proteins among livestock (cattle, pig, chicken, and duck) for raw meats of mixed- and ground-meat products. ○ In the case of non-meat proteins (soya bean, milk serum, egg white, and fish) used in processed meat products, completely different proteins were expressed that are not found in meat proteins, identified through mass spectrometry as bovine albumin serum, Pas-6andPas-7 protein, and ovalbumin. ○ Heat-treated proteins glucose-6-phosphate isomerase, l-lactate dehydrogenase, and carbonic anhydrase in sarcoplasmic protein showed different distributions between livestock species (cattle, pig, chicken, and duck). These can therefore be utilized as markers for identifying livestock species in heated meat (70°C, 30 minutes). ○ The specific proteins in livestock meat and non-meat proteins are not denatured through manufacturing processes such as grinding and mixing; the same proteins remain after manufacturing processes and can be qualitatively identified through mass spectrometry. ○ Technologies were developed for quantitative analysis of raw meat in ground- and mixed-meat products, and field applicability was identified. ○ Developed technologies for identifying livestock meat and non-meat proteins, via qualitative analysis of raw meat using one-dimensional electrophoresis, image analysis, and mass spectrometry of species-specific proteins; and quantitative evaluation by inducing standard quantification curves utilizing the densities of species-specific proteins. 		

Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Construction of a raw meat discrimination system using the multiplex PCR method <ul style="list-style-type: none"> - Finally, after selecting cattle (<i>Bos taurus</i> 7F-7R primer, 667 bp), pig (<i>Sus scrofa</i> 11F-5R primer, 249 bp), chicken (<i>Gallus</i> 2F-4R primer, 721 bp), and duck (<i>Anas</i> 2F-1R primer, 546(564) bp) as species-specific primers, DNA was extracted from ground meat (ham, sausage, pork cutlet, patty, etc.), and conditions for multiplex PCR were established in order to use the DNA as markers for ground meat discrimination and species identification. ○ The multiplex PCR raw meat discrimination system was verified using commercially available mixed-meat products. <ul style="list-style-type: none"> - The multiplex PCR raw meat discrimination system was verified using 52 mixed-meat products, of which five differed from the food composition table. - In one of these five, when the product was repurchased for reverification, the design and contents of the food composition table differed from the original product packaging. - The revised food composition table matched the results from the multiplex PCR raw meat discrimination system developed by the research team. - Therefore, the accuracy of the multiplex PCR raw meat discrimination system developed by the research team was verified. ○ Construction of a raw meat discrimination system using real-time PCR method. <ul style="list-style-type: none"> - Standard curves were set for quantitative and qualitative analysis of mixed-meat products using real-time PCR - Raw meat discrimination using the real-time PCR system was verified with 52 commercially available mixed-meat products, giving the same results as the multiplex PCR raw meat discrimination system - Relative quantitative analysis was conducted of raw meat in meat products; most results matched the contents indicated in the food composition tables. 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Competitiveness in meat product markets can be enhanced through accurate compositional analysis of meat products, thereby encouraging manufacturers to produce high-grade meat products. ○ Industrial intellectual property rights can be secured by patenting the developed analysis technologies. ○ Subsequently, these technologies can be transferred to bio-related industrial companies. ○ Domestic stockbreeders' profits can be secured by scientific verification of the raw meat contents of meat products. ○ Import substitution effects occur for those analysis products or systems that are imported for DNA analysis. ○ Such systems contribute to enhancing public trust by scientific verification of food safety. 				
Keywords	Meat products	Quantitative analysis	Qualitative analysis	DNA	Polymerase Chain Reaction

< Contents >

1. Overview of the research and development	1
2. Present development of technologies in South Korea and overseas	4
3. Scope and results of the study	5
4. Degree of achievement of research goals, and contribution to related areas ·	76
5. Plan for utilizing study results, etc	77
6. Information on overseas scientific technology, collected during the study	77
7. Security grade of the research and development outcomes	77
8. Current overview of research facilities and equipment that have been registered with the national science and technology information system	77
9. Performance record of safety actions for the laboratory, etc., following implementation of the research and development task	78
10. Representative study outcomes of the research and development task	79
11. Other matters	81
12. References	82

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	4
3. 연구수행 내용 및 결과	5
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	76
5. 연구결과의 활용계획 등	77
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	77
7. 연구개발성과의 보안등급	77
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	77
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	78
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	79
11. 기타사항	81
12. 참고문헌	82

1. 연구개발과제의 개요

코드번호 D-03

1) 연구개발 최종 목표

세부	연구개발의 최종목표
1세부	<ul style="list-style-type: none"> - mtDNA 내 유전적 변이 분석을 통한 품종식별 마커개발 - 선발된 마커는 Real-Time PCR 등을 이용한 정량, 정성 성분 분석 방법 개발 - 최종 정량, 정성적 성분 분석 및 품종 식별용 시제품 개발 - 최종 선발된 유전적 변이분석을 통한 품종 식별용 마커개발 및 제품화
1협동	<ul style="list-style-type: none"> - Proteomics 기법을 이용한 신선육 축육별 종특이적 ptorein profiling - 비육단백질(대두단백지, 난백 등) 특이적 protein profiling - 축육별 가열처리를 통해 신선육과 변성 protein 확인 - 시제품을 제조하여 육단백질 및 비육단백질의 protein의 변성 및 정성 분석 - Maldi-TOF를 이용한 종특이적 선발 protein의 질량분석을 통해 정량 분석 - 분쇄 및 혼합육제품 내 종식별 분석을 위한 최적화 분석기술 개발
최종 목표	<u>종 특이적 protein과 유전변이분석을 통해 분쇄 및 혼합육제품의 원료육 정성, 정량 분석 기술 평가 기술 및 종식별 KIT 개발</u>

2) 연구개발의 필요성

【경제적 ·산업적 중요성】

▶ 분쇄 및 혼합육제품이라 함은 축산물 원료에 식품첨가물을 가하거나 그 원형을 알아볼 수 없도록 분쇄, 절단 등의 방법으로 변형시키거나 이와 같이 변형시킨 것을 혼합하거나 또는 다른 식품이나 첨가물을 사용하여 가공한 제품을 말함.

▶ 2가지 이상의 식육의 종류 또는 부위를 사용하는 제품에 있어 제품명으로 식육의 종류 또는 부위명을 사용하고자 하는 때에는 많이 사용한 순서에 따라 원료 식육의 종류 또는 부위명을 제품명으로 사용하여야 함. 이 경우 제품명으로 사용한 식육의 종류 또는 부위명에 대한 함량을 주 표시면에 표시하여야함.

▶ 분쇄 및 혼합육제품 중 프레스 햄이란 식육의 육피를 염지한 것이나 결착제, 조미료, 향신료 등을 첨가한 후 숙성, 건조하거나 훈연 또는 가열처리한 것을 말하며 육함량이 85%이상, 전분 5% 이하로 구성되며 혼합프레스햄은 육함량 75%이상, 전분 8%이하으로 구성함.

▶ 분쇄 및 혼합육제품 중 소시지는 식육을 염지 또는 염지하지 않고 분쇄하거나 잘게 갈아낸 것으로 조미료 및 향신료 등을 첨가한 후 케이싱에 충전하여 훈연 또는 가열처리 한 것으로 육함량이 70%이상, 전분 10%이하로 구성됨.

▶ 분쇄 및 혼합육제품 중 분쇄육제품은 식육을 세절, 분쇄하여 결착제, 조미료, 향신료 등을 첨가하여 혼합한 것을 성형한 것을 육함량이 50%이상의 것을 말함.

- ▶ 전체 분쇄 및 혼합육가제품 중 햄의 소비가 가장 높고 베이컨이 가장 낮으며 총 분쇄 및 혼합육제품 소비량이 187,589톤을 인구 약 5천만 명으로 나누면 1인당 연간 약 3.75kg 소비함.
- ▶ 원가 절감을 위해 저가의 다양한 원료육 즉 가금류 기계발골육, 부산물 등 또는 부재료인 전분, 대두단백질의 혼합제조 하는 경우가 있어 소비자의 신뢰가 낮음.
- ▶ 제품 제조시 대두단백질, 카제인, 난백 등이 사용되는데 이들의 가열처리에 의한 gel화 성질을 이용하여 결착제, 증량제 및 보수력 증강의 효과를 볼 수 있음.
- ▶ 반면, 그 사용이 증가할 경우 저가의 이종단백질을 육단백질과 대체하여 사용함으로써 육제품의 맛과 질을 저하시키며 소비자에게 경제적인 불이익을 야기시킬 우려가 있음.
- ▶ 소비자는 육제품에 대해 인스턴트식품, 튀김 및 냉동식품 등과 함께 식품안전성에 대한 불안을 느끼며, 불안을 느끼는 요인 중 포장재의 불확실한 표시와 생산지 및 원산지 등이 있음(그림 1, 2).

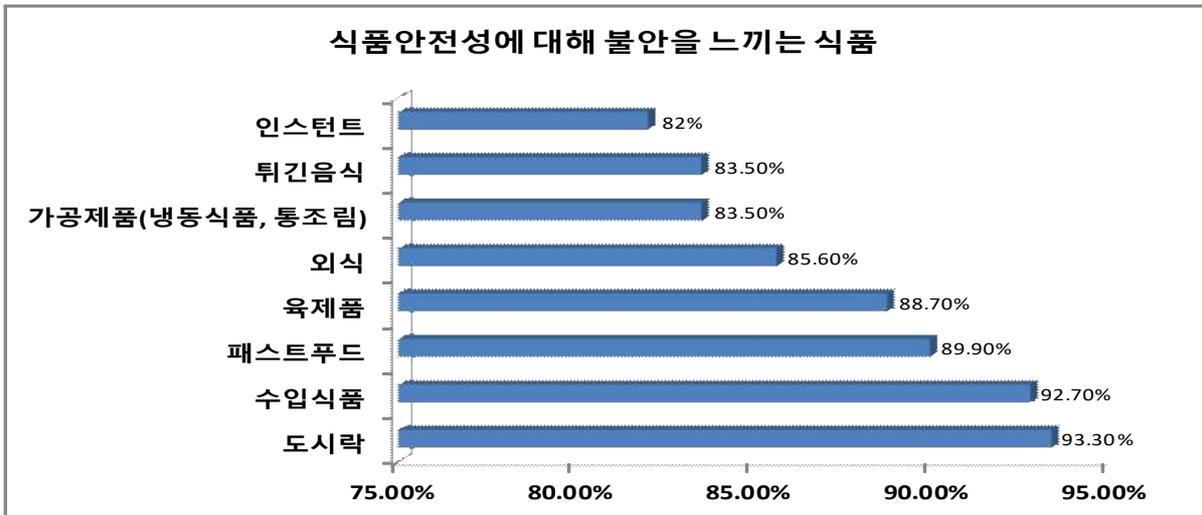


그림 1. 소비자가 식품안전성에 대해 불안을 느끼는 식품(최 등, 2005)

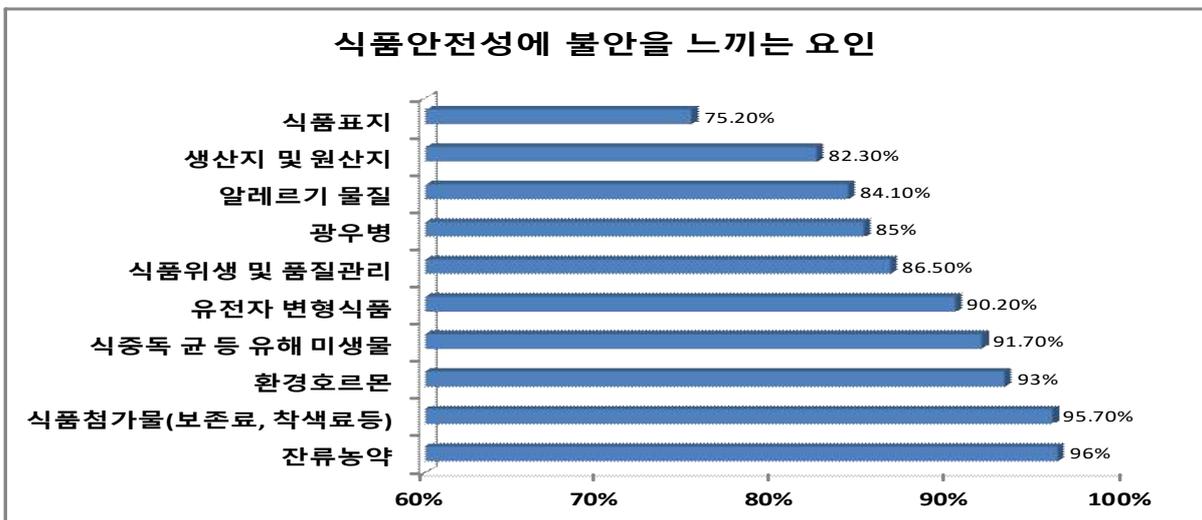


그림 2. 소비자가 식품안전성에 불안을 느끼는 요인(최 등, 2005)

▶ 국제적으로 소비자들의 식품성분에 대한 알 권리를 강조하여 가공식품에 대한 성분표시를 의무화하고 있으며 우리나라도 식품에 대한 표시에 대한 인식이 증가하는 추세이며 이에 따른 분쇄 및 혼합육가공제품의 품질규격 설정이 필요한 실정임.

▶ 국내 육함량 표시기준의 문제점은 살코기와 지방함량을 구분하여 표시하는 미국과는 달리 순수한 육 이외에 지방 및 결체조직 또는 기계발골육(MDCM, mechanically deboned chicken meat) 조차 모두 육함량에 포함시킬 수 있도록 되어있음.

▶ 이로 인하여, 소비자 입장에서 동일한 유형의 분쇄 및 혼합육제품에 대하여 사용한 원료육의 품질구분이 어렵다는 점을 고려했을 때 육함량 표시에 세부사항까지 표시해 주는 것이 필요한 것으로 사료됨.

▶ 식품의약품안전청은 제품명 ‘코주부 치즈육포’ 및 ‘치즈육포’ 제조시 ‘국내산 젓소 18~36%, 호주산 쇠고기 0~18%’를 사용하여 제조하면서 표시사항에 ‘쇠고기 36.6%(호주산)’으로 허위 표시한 업체를 송치하였음.

▶ 또한, 식약청은 유전자분석은 각 식품만이 갖는 고유한 유전자(염기서열)를 확인하는 시험법이므로 분쇄형태 등 육안으로 원재료를 확인할 수 없거나 소량의 가공식품 등에도 적용이 가능하다는 장점이 있다고 설명함.

▶ 이 시험법으로 실제 돼지고기로 만든 장조림을 소고기 향 첨가 후 소고기 장조림으로 둔갑한 제품 및 쥐로 의심되는 고기를 분석하는 등 여러 가짜식품을 판별하였음.

▶ 국립농산물품질관리원은 DNA단일염기다형성 분석법인 SNP를 활용하여 쌀 국내산 및 수입장 30품종 식별법을 개발하여 원산지표시 관리와 시중 유통 쌀의 품종판별에 활용할 수 있어 우리 쌀의 고품질 생산 유도 및 부정유통 방지에 크게 이바지 할 것으로 기대함.

▶ 관세청 또한 근적외선분광광도계(NIRs), 엑스선형광분석기(XRF) 및 유도결합플라즈마질량분석기(ICP/MS) 등과 같은 첨단분석장비를 사용하여 육안이나 서류만으로 원산지를 구별하기 어려운 농수산물을 효과적으로 분석할 수 있을 것으로 전망함.

【본 연구개발의 필요성】

▶ 분쇄 및 혼합육제품 제조시 첨가되는 다양한 원료에 대한 표시 및 관리제도가 미흡하며 육제품의 품질 설정을 위해서는 최종 제품의 원료 종류 및 함량을 분석할 수 있는 기술이 필요함.

▶ 분쇄 및 혼합육제품은 원료육을 세절하여 가공하기 때문에 제품화하였을 때 원료성분의 함량, 저급 및 폐기육의 사용 유무를 확인할 수 있는 방법이 없음.

▶ 식품공정, 법령의 경우 분쇄 및 혼합육제품의 제조 기준과 포장재 표시 사항 등의 내용은 기입되어 있지만 원료성분의 확인 가능한 분석 방법에 대한 규정은 없는 실정임.

▶ 따라서 본 연구는 육제품 원료육 정량 및 정성 기술 개발을 통해 불투명한 육가공제품 제조 공정을 개선하고, 그로 인해 소비자들의 인식 개선 및 육제품 소비를 확대하고자 함.

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

▶ 허위기재식품은 농어민과 정상적인 식품 제조회사의 소득증대를 저하시키고 국민의 건강을 위협하고 유통질서를 파괴시키는 주범으로 유럽에서는 European Union Regulation (EUR)을 규정하여 식품으로부터 소비자를 보호하기 위해 식품안전과 이력 추적제를 추진.

미국 의식품의약품청(FDA)과 영국식품기준청(FSA) 등에서도 늘어나고 있는 허위기재식품에 대한 관리를 강화.

▶ DNA분석을 통해 염기서열 및 원산지 확인 여부를 위한 연구는 농축산분야에서 다방면으로 이루어져 있지만 육가공제품에 있어 성분 분석을 위한 연구는 미흡한 상태임.

▶ 최근, 근적외선분광분석법(NIRs)을 이용하여 농축산물의 수분, 지방, 단백질 등 구성성분의 각기 다른 흡수 파장대를 비교하여 식품원료의 원산지 판별 및 정성 및 정량 분석에 이용되고 있음.

표1. 국내외 연구 동향 조사표

구분	국 내		국 외	
Keywords	육제품	- 정량 분석 - 정성 분석	Sausage	- Qualitative analysis - Quantitative analysis
검색방법	KISS		SCOPUS	
검색건수	1		103/370	
주요 연구내용	- 분쇄 및 혼합육제품에 첨가되는 대두 단백질의 정량을 위하여 면역분석법을 통해 항체생산, 면역성 및 반응성 조사, 반응성에 영향을 미치는 요인 조사.		- 돼지 품종 및 배합차이에 따라 소시지를 제조 후 근적외선 분광분석법으로 제품별 성분 차이 확인. - 육제품을 근적외선 분광분석법을 이용하여 성분 분석을 통한 품질 비교. - 원료육 별 가열 전, 후 2D 분석을 통해 단백질 분석 .	
비고	- NIRs, PCR 및 Protein 분석을 통해 원료육의 일반성분 함량, 숙성정도 및 안전성을 평가하는 연구는 있지만 육제품 원료육의 정량 및 정성 분석에 관한 연구는 없음.		- 근적외선 분광분석법과 같이 비파괴 분석법을 통해 원료육의 수분, 지방 및 단백질 등을 분석하는 연구는 있지만 육제품을 분석한 연구는 전무함. - SDS-PAGE, 2D를 통해 신선육 및 가열육에 대한 연구는 있지만, 기존의 육가공제품에 접목시킨 연구는 없음.	

▶ 명태를 이용한 수산제품 중 수리미를 근적외선분광분석법을 통해 일반성분 및 전분을 분석한 결과 신속성 및 재현성이 높아 성분분석에 있어 효과적이거나 식육을 이용한 육가공제품에는 접목시킨 사례가 없음.

	코드번호	D-04
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 초음파 측정법을 이용한 식육의 지방함량을 측정하려는 연구가 수행되었으며(Park et al., 1994), 근적외선 분광분석법을 이용하여 식육의 각종 성분함량을 측정(오은경과 Grosskaus, 1992), 닭고기의 안전성을 평가하는 연구(Park et al., 1996) 및 바이오센서(Yano et al., 1995)를 이용하여 시간의 변화에 따른 신선육의 숙성도와 신선도를 판전을 위해 아민류를 측정하는 연구도 진행되고 있음. ▶ 그러나 이러한 분석법의 이용은 식육을 이용한 지방, 수분, 단백질 등의 성분 측정에 관한 연구에 집중되어 있으며, 식육을 이용한 육가공제품에 관한 연구는 거의 진행되지 않고 있음. ▶ DNA는 조직의 근원과 상관없이 내열성이 높고 많은 세포가 존재하여 동물로부터 잠재된 식별정보를 얻을 수 있어 종 식별연구에서 유리함(Ballin et al., 2009). ▶ 가공식품에 사용된 식품 원료를 확인하는 방법에는 크게 단백질과 DNA를 기반으로 하는 분석방법이 있는데 high performance liquid chromatography(HPLC)와 enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA) 등 단백질분석법은 가공된 제품안의 근연종의 차이를 식별할 때 덜 민감하고 가공하는 동안 단백질이 변성될 우려가 있으며 시간소모가 크다(Xin et al., 2014). ▶ 국내외 연구에 의하면, 다양한 분석 기법을 이용하여 원료소재를 분석한 연구가 이루어져 있지만 분쇄 및 혼합육제품을 이용한 연구는 전무함. ▶ 여러 가지 비파괴 물성 측정 장치 및 센서를 이용한 육류의 품질, 성분 예측 및 안전성 평가 등에 관한 기술 개발이 진행되고 있지만 육제품을 대상으로 한 연구는 국내외 부족함 실정임. 		

3. 연구수행 내용 및 결과

	코드번호	D-05
<p>【최종 연구 결과 요약】</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Multiplex PCR 법을 이용한 원료육 판별 시스템 구축 및 시판 육제품을 통한 시스템 검증 ▶ Real-Time PCR 법을 이용한 원료육 판별 시스템 구축 및 절대정량 분석 ▶ 1, 2차원 전기영동법과 질량분석법을 통한 축종별 또는 축종간 사이적 발현 단백질 비교 ▶ 2종 이상의 이성체를 가지고 있는 단백질 비교를 통한 축종 구분 ▶ 가열한 원료육의 단백질 분석 및 신선육과 비교하여 종 특이 단백질의 열처리에 따른 변이 및 정성 확인 ▶ 비육단백질(non-meat protein)로 이용되는 대두단백과 난백의 특이 단백질을 탐색 및 제품 내 정성확인 조건 탐색 ▶ 질량분석을 통한 대표적인 비육단백질(non-meat protein)의 특이 단백질 정성 확인 ▶ 분쇄, 혼합 등 제조공정을 통해 축육 및 비육단백질(non-meat protein)의 특이 단백질 변성 및 정성 확인 ▶ 질량분석을 통해 제품 내 축육별 종 특이 단백질의 정량분석 최적화 적립 ▶ 육제품의 품질설정을 위해 최종제품의 원료육 및 함량 분석 가능한 기술 개발 		

■ 제1세부 과제 연구 내용

▶ Multiplex PCR 법을 이용한 원료육 판별 시스템 구축

○ 품종 식별을 위해 mtDNA 내 유전적 변이를 이용한 식별 키트 개발

- 생물의 여러 유전자 중에서도 다양한 생물군에서 마커로서 사용되고 있는 mtDNA는 의미있는 유전자원 중 하나이다. 따라서 축종별 mtDNA sequencing을 통하여 축종별 특이 유전적 변이 선별을 하고자 NCBI(National Center for Biotechnology Information, 미국국립생물정보센터)에 등록되어 있는 소(*Bos taurus*, NC_006853.1), 돼지(*Sus scrofa*, NC_000845.1), 닭(*Gallus gallus*, NC_001323.1), 오리(*Anas platyrhynchos*, NC_009684.1)의 mtDNA의 염기서열을 수집함.

- 소의 mtDNA 염기서열 (*Bos taurus*, NC_006853.1)

```
>gi|60101824|ref|NC_006853.1| Bos taurus mitochondrion, complete genome
ACTAATGGCTAATCAGCCCATGCTCACACATAACTGTGCTGTCATACATTTGGTATTTTTTTATTTTGGG
GGATGCTTGGACTCAGCTATGGCCGTCAAAGGCCCTGACCCGGAGCATCTATTGTAGCTGGACTTAACTG
CATCTTGAGCACCAGCATAAATGATAAGCATGGACATTACAGTCAATGGTACAGGACATAAATTATATTA
TATATCCCCCTTCATAAAAAATTTCCCCTTAAATATCTACCACCCTTTTAAACAGACTTTCCCTAGAT
ACTTATTTAAATTTTTTACGCTTTCATACTCAATTTAGCACTCCAAACAAAGTCAATATATAAACGCAG
GCCCCCCCCCCCCGTTGATGTAGCTTAACCCAAAGCAAGGCACTGAAAATGCCTAGATGAGTCTCCCAAC
TCCATAAACACATAGGTTTGGTCCCAGCCTTCTGTAACTCTTAATAAACTTACACATGCAAGCATCTA
CACCCCAGTGAGAATGCCCTCTAGGTTATTAATAACTAAGAGGAGCTGGCATCAAGCACACACCCTGTAGC
.....
TCGAACCCCATATATCACCATCGGACAACCTAGCATCTGTCTTACTTTCTCCTCATCCTAGTGCTAAT
ACCAACGGCCGGCACAATCGAAAACAAATTACTAAAATGAAGACAGGTCTTTGTAGTACATCTAATATAC
TGGTCTTGTAACCAGAGAAGGAGAACAACCTAACCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAACTGCAGTCTCACC
ATCAACCCCCAAAGCTGAAGTTCTATTTAACTATTCCCTGAACACTATTAATATAGTTCATATAATACA
AAGAGCCTTATCAGTATTAATTTATCAAAAATCCCAATAACTCAACACAGAATTTGCACCCTAACCCAAA
TATTACAAACACCCTAGCTAACATAACAGGCCATACACAGACCACAGAATGAATTACCTACGCAAGGG
GTAATGTACATAACATTAATGTAATAAAGACATAATATGTATATAGTACATTAATTTATATGCCCATGC
ATATAAGCAAGCACATGACCTCTATAGCAGTACATAAATCATATAAATTATTGACTGTACATAAATACATTA
TGTCAAATTCATTCTTGATAGTATATCTATTATATATTTCTTACCATTAGATCAGGAGCTTAATTACCAT
GCCGCGTGAACCCAGCAACCCGCTAGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAACCGTGGGGGT
CGCTATCCAATGAATTTTACCAGGCATCTGGTTCTTTCTTCAGGGCCATCTCATCTAAAACGGTCCATTC
TTTCTCTTAATAAGACATCTCGATGG
```

- 돼지의 mtDNA 염기서열 (*Sus scrofa*, NC_000845.1)

```
>gi|5835862|ref|NC_000845.1| Sus scrofa mitochondrion, complete genome
CAACCAAAACAAGCATTCCATTTCGTATGCAAACCAAACGCCAAGTACTTAATTACTATCTTTAAAACAA
AAAAACCCATAAAAAATTGCGCACAAACATACAAAATATGTGACCCCAAAAATTTTACCATTGAAAACCAA
AAATCTAATATACTATAACCCTATGTACGTCGTGATTAATTGCTAGTCCCATGCATATAAGCATGTAC
ATATTATTATTAATATTACATAGTACATATTATTATTGATCGTACATAGCACATATCATGTCAAATAACT
CCAGTCAACATGCATATCACCACCCTAGATCAGGAGCTTAACTACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCC
GCTTGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAACCGTGGGGGTTTCTATTGATGAACTTTAAACA
GGCATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTTCCCCTTAAATAAGACATCT
CGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTTGGTATTTTTTAAT
TTTTGGGGATGCTTAGACTCAGCCATGGCCGTCAAAGGCCCTAACACAGTCAAATCAATTGTAGCTGGAC
.....
CGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTTCCGTGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTCGCCTTCCACTTT
ATCCTGCCATTTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTCTGACGAAACCCGGATCCAACA
ACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCATTTTACCCATACTACACTATTAAGACATTCT
AGGAGCCTTATTTATAACTAATCCTACTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCA
GACAACTACACCCAGCAAACCCACTAAACACCCCAACCCATATTAACCCAGAATGATATTTCTTATTG
CCTACGCTATTCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGTGGCCCTAGTAGCCTCCATCCTAAT
CCTAATTTTAAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAAATTTTCGACCCTAAGTCAATGC
CTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGAGGACAACCCGTAGAACACCCGT
TCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATACTTCTAATCATTCTAGTATTGATACCAATCACTAG
CATCATCGAAAACAACCTATTAAAATGAAGAGTCTTCGTAGTATATAAAATACCCTGGTCTTGTAACCA
GAAAAGGAGGGCCACCCCTCCCCAAGACTCAAGGAAGGAGACTAACTCCGCCATCAGCACCCAAAGCTGA
AATTCTAACTAAATTATTCCCTG
```

- 닭의 mtDNA 염기서열 (*Gallus gallus*, NC_001323.1)

```
>gi|5834843|ref|NC_001323.1| Gallus gallus mitochondrion, complete genome
AATTTTATTTTTTAACTAACTCCCCTACTAAGTGTACCCCCCTTTCCCCAGGGGGGTATACTATGCA
TAATCGTGCATACATTTATATAACCACATATATTATGGTACCGGTAATATATACTATATATGTAATAACC
CATTATATGTATACGGGCATTAACCTATATTCCACATTTCTCCCAATGTCCATTCTATGCATGATCTAGG
ACATACTCAATTTACCCTCCCATAGACAGTTCCAAACCACTATCAAGCCACCTAACTATGAATGGTTACA
GGACATAAATCTCACTCTCATGTTCTCCCCCAACAAGTCACTAACTATGAATGGTTACAGGCATACA
TTTAACTACCATGTTCTAACCCTTTGGTTATGCTCGCCGTATCAGATGGATTTATTGATCGTCCACCTC
ACGAGAGATCAGCAACCCCTGCCTGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATGTAATG
CCCCCTCGCCCTACTTGCCTTCCACCGTACCTCTGGTTCCTCGGTGAGGCACATCCCATGCATAACTCCTG
AACTTTCTCACTTTTACGAAGTCATCTGTGGATTATCTTCCCCTCTTTAGTCCGTGATCGCGGCATCTT
.....
CTCTCTTACTTCACCATCCTACTTATCCTCTTCCCCACAATCGGAACACTAGAAAACAAAATACTCAACT
ACTAAAATACTCTAATAGTTTATGAAAAACATTGGTCTTGTAAACCAAAAACCTGAAGACTCCACCCTTCT
TAGAGTATCAGAAAAGGAGGGCTCAAACCTCCATCTCCAGCTCCCAAAGCTGGTATTTTCAAATAAACTA
CTCTCTGAAACCCTTAAACCGCCCGAATTGCCCCCGAGACAAACCCACGCACAAGCTCTAGTACAACAAA
CAAAGCTAACAAACAACTCACCCAGCCACCAAAAACAACCAACCCACATGAATAAAAACACCGCAACT
CCACTAAAATCCAACCGAGCAAAAGACACACCCCGCCATCAACAGTAACCACCCCCACCTTTCAAATAA
CAACGAGCCCTCCCAGAACCACCCCATTAACACCAAGACAAAACCTAGCCCATACCCACCACCCCG
CCAATCCCCCAAGCCTCAGGATAAGGATCCGCAGCTAATGACACAGAATAAAACAAAACCAACACATC
CCCCCTAAATACACCAAAAATAACGCCAAGGAAACAAAAGAAACACCCAAACTCACTAACCACCCACATC
CTATCACAGACGCTACCACCAACCCACCACCCATAATACGGCGAAGGATTAGACGCCACAGCTAAAAC
CCCCAGCATAAAAACAAATCCCAAGAAAAATCACAAAATAAGTCATATTATTCCCCTTGGTTAGACCCCA
AGGACTACGGCTTGAAAAGCCATTGTTGTTCTCAACTACGGGAAC
```

- 오리의 mtDNA 염기서열 (*Anas platyrhynchos*, NC_009684.1)

```
>gi|154125702|ref|NC_009684.1| Anas platyrhynchos mitochondrion, complete gen
AGCTAGAATAGCCTAATAATGCTCTCAGGACCCCCCCCCCTTCCCCCCCCAGGGGTTGCGGGTTATTT
GGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATT
AACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTAC
CCTCCCAATGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGTCCCCAACCA
GAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCTCTCCACCCA
CCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCT
TGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACAT
TTTTGCGCCTCTGGTTCCCTCGGTGAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCTTCAAAGTG
GCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCCTCCAGCTTTTTTGGCGCCTCTGGT
.....
CATCATCATCGGGCAACTCGCATCAATTACTTACTTCACCATCCTCCTATTCTTTTCCCTGCCGTAAGC
GCCCTAGAAAACAAAATGCTTAACTGCTAAATACTCTAATAGTTTATACAAAACATTGGTCTTGTAAACC
AAAGACTGAAGACTAACCCTTCTTAGAGTACTCCAGGCCCTCAGAAAAAAAGGGATTAAACCTTTATCT
CCAGCTCCCAAAGCTGGTATTTTACAATAAACTATTCTCTGATCCCGACCCCTAAACTGCCCTAAGC
CCCCGAGACAACCCCGCACAAAGCTCCAACACAACAAATAAAGTCAACAAGAGCCCTCAACCTGCAACCA
AAAACATCCCAACCCACGCGAATAAAGCATAGCCACCCCACTAAAATCCAGCCGTACAGTAAACATTCC
AACACTATCAACAGTTACAACCCCTAACCCCCAAGACCCAAACACCCGCCCAATACCAACCCCCCTAAA
ACCACCGCCGCAAGTGCCGCGCATGCCAACCACACGTCAATCCCCCAAGCTTCCGGAAAAGGCTCCG
CGGCCAGAGCTACAGAGTAGACAAATACCACCAACATGCCCCCCAAATACACCATAAACAGCACCAGGGC
TACAACAGAAACCCCGAGGCTCAATAACCACCCACACCCAGCCACAGATGCTAAAACATAAGCCAATACC
CCATAGTACGGCGAAGGATTGATGCTACACCTAAAACACCCACAACAAAGCAGATTCTAGAAAAAATA
CAAAAATAAGTCATTATTCTGCTCGGCCACTACCCGAGACCTACGGCTCGAAAAGCCGTTATTGTTATTT
TCAACTACAAGAAC
```

○ 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) 수집되어진 mtDNA의 염기서열의 14개 유전자(D-loop, ND1, ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6, Cyt_B)들을 축종별 특이적인 서열을 찾기 위하여, clustalW 프로그램을 이용하여 alignment 실시함.

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) D-loop 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_ND1      ATG TTC-----ATAATTAAC-----ATCTTAATACTA-----ATTATTCCCATC 39
pig_ND1      ATG TTC-----ATAATTAAT-----ATTCTAAGCCTA-----ATTATTCTTATC 39
chicken_ND1  ATG ACCCTGCCACCCCTAACAAACCTTCTAATCATAACCTTATCCTATATTCTCCCATC 60
duck_ND1     ATG CCACAACAACAATAGTAAGCTACCTCATTATAGCCCTGCTATACATCATCCCAATC 60
***                ** *          ** ** *          ** * ** **

bos_ND1      CTATTGGCCGTAGCATTCCCTTACGTTAGTGGAAACGAAAAGTTCTAGGCTATATACAAC 99
pig_ND1      C TACTGGCCGTAGCATTCCCTCACCCTAGTAGAACGAAAAGTGCTAGGTTATATGCAACT 99
chicken_ND1  C TAAATCGCCGTGGCCTTCTTAACTTTGTAGAACGAAAATCCTAAGCTACATGCAGGCC 120
duck_ND1     T TAAATGCCGTGGCTTTCTTGACTCTAGTCGAACGAAAATTTCTAAGCTACATGCAATCC 120
*** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

bos_ND1      CGAAAAGGTCCAAATGTCGTAGGTCCATATGGCCTACTTCAACCCATCGCCGATGCAATC 159
pig_ND1      C GAAAAGGACCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTCCAACCCATCGCCGATGCCCTA 159
chicken_ND1  C GAAAGGGCCCAAACATTGTGGGCCCTTTTGGTCTACTCCAACCCGTTGCAGACGGGGTA 180
duck_ND1     C G TAAAGGCCCAACATCGTGGGGCCTTTTGGCCTGCTCCAACCCATTGCAGACGGAATC 180
*** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

bos_ND1      A AACTTTTCATTAAGAACCCTACGACCCGCTACATCTTCAGCCTCAATATTTATCCTA 219
pig_ND1      A AACTAGTCACCAAAGAACCCTACGACCAGGCACATCCTCAATCTCCATGTTTATTATT 219
chicken_ND1  A AACTATTTCATTAAGAGCCAATCCGACCATCTACCTCCTCCCTTCTCCTTATTATT 240
duck_ND1     A AACTATTTCATTAAGAGCCCATTCGACCTTCCACCTCCTCACCCTCCTTCTTATCATA 240
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

      .
      .
      .
      .
      .

bos_ND1      A GAACTCTACACAATCAATTTTACCATTAAATCCCTACTGCTCACAATATCCTTCTATG 815
pig_ND1      A GAACTATATACAATCAACTTCGTACTAAAAACACTCGCATTAAACAATCACCTTCTATG 815
chicken_ND1  A GAATTATTTCCATTGCACTCGCTACAAAAACCCTCCTCCTTTTATCCTCATTCTATG 836
duck_ND1     A GAGCTATTTCCCATCATCCTAGCCACAAAAGTCCCTCCTTCTATCCTCCGGCTTCTATG 836
*** * * ** ** *          *** ** *          ** ** **

bos_ND1      A ATCCGAGCATCCTACCCTCGATTTCGCTATGACCAACTAATACACTTACTATGAAAAAA 875
pig_ND1      A ATCCGAGCATCATACCCACGATTCGGATACGACCAACTAATACATTTACTATGAAAAAG 875
chicken_ND1  A ATCCGGGCTCATATCCACGGTTCGGCTATGACCAACTAATACATCTTCTATGAAAAAA 896
duck_ND1     G GTCCGAGCCTCCTACCCCGATTCGGATATGACCAGCTTATGCACCTCCTATGAAAAAA 896
*** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

bos_ND1      T TTTCTACCTCTGACACTAGCCCTGTGCATGTGACACGTATCCCTACCCATCC-TTACAT 934
pig_ND1      C TTCTGCCCCTAACACTAGCTCTATGTATATGACACATCTCACTCCCTATTA-TAACAG 934
chicken_ND1  C TTCTCCCCCTAACCTAGCCTTATGCCTCTGACATACCAGCATACCAATCAGCTACG- 955
duck_ND1     C TTCTACCCCTCACACTAGCCTATGCCTCTGACACACTAGCCTACCCATCTGCTACG- 955
*** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

bos_ND1      C AGGCATCCCACCACAAACATA- 956
pig_ND1      C AAGCATCCCCCACAATCAT-- 955
chicken_ND1  C CGGCCTCCCCCAATC-TAA-- 975
duck_ND1     C AGGCCTACCTCCTTCCACAAGG 978
* * * * *
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) ND2 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_ND2      ATAAACCCAATTATCTTTATTA-TTATTCTACTAACCATTATACTAGGAACTATTATTGT 59
pig_ND2      ATTAATCCCATTATCTACACTA-CCCTTATCATAACAGTAATGTCCGGAACCATACTAGT 59
chicken_ND2  ATGAACCCCATG-CAAACTAATCTGCACAGTAAGCCTCATCATGGGAACCAGCATCAC 59
duck_ND2     ATGAACCCCATG-CAACCCAGTCCTAGTCCTCAGTCTCGCATTAGGCACAACAATCAC 59
          ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND2      CATAATCAGTTCTCACTGACTACTTGTCTGAATCGGGTTTGAATAAATACTCGCCAT 119
pig_ND2      AATAATCAGCTCACACTGACTACTCATCTGAATCGGATTCGAAATAAACCTATTAGCAAT 119
chicken_ND2  AATCTCCAGCAACCATTGAATCTTAGCCTGAACAGGCTTAGAGATCAACACCTTAGCCAT 119
duck_ND2     AATCTCTAGCAACCACCTGAGTCCTAGCCTGAACCGGACTAGAAATTAACACACTAGCCAT 119
          ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND2      CATCCCCATCATAATAAAAAATCACAACCCACGAGCTACAGAAGCATCAACTAAATATT 179
pig_ND2      AATCCCAGTATTAATAAAAAATTTAACCCACGAGCCACAGAAGCAGCCACAAAATATT 179
chicken_ND2  CATCCCCCTCATCTCCAAGTCACACCACCCCGAGCGATTGAAGCCACTATCAAATATT 179
duck_ND2     CATCCCCCTAATCTCCAAATCCCACCACCCGCGAGCAGTAGAAGCCGCGACAAAATACT 179
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND2      TTTGACTCAATCAACAGCCTCAATACTACTAATAATAGCCGTCATCATTAACGTAATATT 239
pig_ND2      CCTAACACAAGCCACAGCCTCCATAATACTAATAATAGCCATCATCATCAACCTCTATA 239
chicken_ND2  CCTCACCAATCAACTGCATCAGCCCTAATCCTTCTCGAGCATAACCAACGCCTGATC 239
duck_ND2     CTTGACACAGGCAGCTGCCTCCGCCCTAGTACTATTCTCCAGCATAACCAACGCCTGAGC 239
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          .
          .
          .
          .
          .

bos_ND2      CTACCCACTTTTCATAGCAATCACAGCTCTACTAAACTTATATTTTTATATACGACTCAG 891
pig_ND2      ATGCCAACACTCATAGCAATAACAGCACTGCTAAACCTCTATTTCTACATACGACTAGCC 891
chicken_ND2  ATAGCCACAATCATCACAATACTATCACTCCTAAGCCTATTCTTCTACCTCCGACTTGCA 891
duck_ND2     GCAGCCATAGCAATCGCCATGCTATCCCTACTTAGCCTATTCTTCTACCTACGCCTCGCA 891
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND2      TATTCTACCACACTAACAATATTTCC---CTCCACAAACAACATAAAAAATAAAATGACAA 948
pig_ND2      TACTCCTCCTCACTGACTATGTTCCC---ATCCACCAACAACATAAAAAATAAAATGACAA 948
chicken_ND2  TACCACTCAACAATCACACTCCCCCCAACACTCAAACCACATAAAA---CTCTGACG- 947
duck_ND2     TACCACTCAACAATCACCTCCACCAAACTCGTCCAACCACATAAAA---CAGTGGA- 947
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND2      TTTCCCTTATGAAA---AAATAACTTTTCTACCAACAATAGTCGTATTATCTACCATA 1005
pig_ND2      TTCGAACACACAAAAC---AAATAAAATTACTTCCACATAAATTGTATTATCAACACTA 1005
chicken_ND2  ----AACTAACAAAACCCCTAAACACCCCCACCGC-CATTCTAACTGCGCTATCAACCACC 1002
duck_ND2     ----CACTAGCAAACCCCAAGCAGCCACCGC-AATCCTAGCCTCACTATCAATCCTC 1002
          * ** * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND2      AACTACCCTCAGCC---AATACTATCAGTGTTAGAAT-- 1042
pig_ND2      GTCCTACCTATAACACC---AGCCCTCTCGTCCCTAAACT-- 1042
chicken_ND2  CTATTGCCCTTTCCCCCTAATTATTACATACTATAG--- 1041
duck_ND2     CTACTCCCCTCTCCCCATAGT-----CCACGCTATTGTCT 1039
          * * * * * * * * * * * * * *
    
```


- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) ND4 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_ND4      ATGCTAAAATACATTATTCCAACAATTATACTTATAACCCCTAACCTGGTTATCAAAAAAT 60
pig_ND4      ATGCTAAAATATTATTATCCCAACAACAATACTACTACCCATAACATGAATATCTAAACAC 60
chicken_ND4  ATGCTAAAGATCATCCTACCAACAATCATACTCTTGCCACAGCCCTCTTATCCCCAGCA 60
duck_ND4     ATGCTAAAAGTTATCCTACCAACAATTATACTACTCCAACAGCCCTACTATCCCCTCCA 60
*****      * * * ***** * * * * * * * * * * * *

bos_ND4      AATATAATTTGGGTTAACTCCACAGCACACAGCCTTCTAATTAGCTTTACAAGCCTCCTC 120
pig_ND4      AACATAATCTGAATCAATGCAACAGTACATAGTCTCCTCATTAGCCTGATCAGTCTATCC 120
chicken_ND4  AAATCCATATGAACTAACACCACAATATACAGCCTTCTAATCGCCTCGATCAGCCTACAC 120
duck_ND4     AAATTCCTGTGAACTAATACTACCATGTATAGCCTGCTAATTGCCGCCCTCAGCCTCCAA 120
**          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND4      CTCATAAACCAGTTTGGCGAC-----AACAGCCTTAATTTTTCTACTACTATTTTTCTCCG 175
pig_ND4      CTACTAAACCAACTAGGCGAA-----AACAGCCTTAATTTTTCTTAACATTCTTCTCCG 175
chicken_ND4  TGACTAACCCCATCATACTACCCACAAAAACCCTAACCCCTG--AACAGGCATA---G 175
duck_ND4     TGACTAATCCCAGCTACTACCCCTACAAATTCCTGTCCAATTG--AACAGGAATC---A 175
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND4      ACTCCCTATCCACTCCACTACTAATTTTTAACCATATGGCTCCTCCCTCTAATACTAATAG 235
pig_ND4      ACTCACTATCAGCACCCCTACTAGTTCTAACCACATGACTCCTCCCCCTTATACTAATAG 235
chicken_ND4  ACCAAATCTCAACTCCCCTCTTAGTACTCTCCTGCTGGTTTCTCCCCCTCATAATTATAG 235
duck_ND4     ACCAAATCTCCTCCCCCTCCTGGTGCTATCCTGCTGACTCCTCCCGCTTATAATCATAG 235
**          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          .
          .
          .
          .

bos_ND4      GGAGTAAATATAGTAATCACCGCCCTATATTCTCTATACATGCTAATTATAACCCAACGA 1248
pig_ND4      GGAATAAACATAATAATTACAGCCCTCTACTCTCTCTACATACTAATTACTACACAACGA 1248
chicken_ND4  GGCACGTGCAACACTCCTAACCGCCTCTTACACCCTCTACATACTACTCTCAACCCAACGA 1248
duck_ND4     GGAATTGCCACCCTACTAACCGCATCATAACCTTATTTCATGCTGCTAGTCACCCAACGG 1248
**          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND4      GGAAAATATACCTACCACATTAATAATATCTCGCCTTCCTTTACACGGGAAAATGCACTC 1308
pig_ND4      GGAAAATACACCCACCACATTAACAACATCAAAGCCTCATTACACAGAGAAAACGCCCTC 1308
chicken_ND4  GGCACCTCTCCATCCCACATCACAACAACCCCAACTCAAACACTCGAGAACATCTTCTC 1308
duck_ND4     GGCTCAATTCCCTCCCATATCACATCCATTCAAAACTCAACCACACAGAGACCTGCTC 1308
**          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND4      ATATCATTACACATCCTACCCCTACTACTCCTAACCCCTAAACCCAAAAATTATTCTAGGA 1368
pig_ND4      ATAGCCCTACATATTCTACCACTACTACTGACCTTAAACCCCTAAAATAATCCTAGGA 1368
chicken_ND4  ATAACCCCTCCACATCATCCCCATACTAACACTCATCCTCAAACCAGAACTAATCTCAGGA 1368
duck_ND4     ATAACACTCCACATCATCCCCATGTTCTCTTGATCCTCAAGCCCGAACTAATCTCTGGA 1368
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND4      -CCTCTATACT 1378
pig_ND4      -CCCCTTACT 1378
chicken_ND4  ACCCCTCTAT- 1378
duck_ND4     GCCCCCTTAT- 1378
** * **
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) ND5 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_ND5      ATAAA-----CATATTCTC---CTCACTCTCACTAGTTACTTTACTCTTACTAACTACA 51
pig_ND5      ATAAA-----CCCATTCGC---CTCACTCACATTAACCACACTAATTATTCTAACCATC 51
chicken_ND5 ATGGAGACTCCACTGCTCCTTAACACCCTCACAAACATTAACACTACTCACCCTCCTTACC 60
duck_ND5     GTGAATGCGACCCTACTCATTAACTCCCTCACACTCCTCACACTAACCATCCTCCTAACT 60
          * *                ** * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND5      CCCATTATAAT---ATAAGCTTTAACA-CCTACAAACCTTCCAACCTACCCACTCTA-CG 106
pig_ND5      CCAATTATAAT---ATCCAACCTCAAACA-TCTACAAAACCTAACCTTTACCCTAACTA-CG 106
chicken_ND5 CCTATTATCCTTCCCCCCTCCTAAA---TCTAAAAAACTCCC-----CCATATCCATCA 112
duck_ND5     CCAATCATCCTCCCACTCCTCTTTAAGGGCTTTAAAAACACCC-----CCCTCTCTATCA 115
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND5      TAAAAACAGCTATCTCATACGCCTTCATTACCAGCATAATTCCCACAATAATATTTATCC 166
pig_ND5      TAAAAACCACCGTATCCTACGCCTTCACTCTCAGCCTAGTCCCCTTACTAATATTTATAC 166
chicken_ND5 CCAAAACCATTAATAAC---CGCCTTCTAATCAGCCTAATCCCAACAACAATCTTCATCC 169
duck_ND5     CTCGCACCGTAAAAGC---TGCATTTCTAACAAGCCTGGCCCCAACAACACTACATTCATCT 172
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND5      ACTCAGGCCAAGAATAATTATTTCAAACCTGACACTGACTAACCATCCAAACTCTTAAAT 226
pig_ND5      ACACAGGCCAAGAAATAATCATTTCAAACCTGACATTGAATAACCCTACAGACCGTAGAAC 226
chicken_ND5 ACTCAGGGGCAGAAAGCATTGCCACCCTGAGAATGACAATTTATCCCAACTTCAAGA 229
duck_ND5     ACTCCGGACTAGAATCCATTACCTGCCACTGAGAATGAAAATTTATCATAAACTTCAAAA 232
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          .
          .
          .
          .
          .

bos_ND5      CCTTCTAGACCTAATCTGACTAGAAAGCCATCCTACCAAAAA-----CCATCTC--ACT 1703
pig_ND5      ATTACTAGACTTAATTTGACTAGAAACTATTCTACCAAAAA-----CAACCTC--TTT 1703
chicken_ND5 CTTAATCGACATAGCATGGTACAAAAAATAGGGCCCCGAAAGGCCCTTGCCAACCTTCATCT 1712
duck_ND5     CCTAATCGACCTCTCCTGGCTCAAAAAAATAGGGCCAGAGGGCCTCGCCGAGCTGCAGGT 1715
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND5      CGCCCAAATAAAAAGCATCTACCCTGGTCACAAACCAAAAAGGCCTGATCAAACCTATATTT 1763
pig_ND5      CATCCAAATAAAAAATATCAATCATAGTATCAAATCAAAAAGGCCTAATCAAACCTATACTT 1763
chicken_ND5 CACCATAACCAAAATCTCAACCACACTC-----CACACAGGCCTAATTAATCTTACCT 1766
duck_ND5     AGCCGCAAGCAAAGCCGCAACCCTGGCA-----CACACGGGCTTATCAAACCTACTT 1769
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND5      CCTCTCCTTCTTAATCACAATCCTTATCAGCATAATCTTATTTAATTTCCACGAGT---A 1820
pig_ND5      TCCTCTCCTTCTTAATCACTATTATAATCAGCATAACACTATTTAATTTACCACGAGT---A 1820
chicken_ND5 GGGTTCCTTCGCCCTCACAATCCTTACAA---CGATCCTACTTA---TCCAAAAAT---A 1817
duck_ND5     AGGATCTTTCGCCCTATCCATCCTAGTAA---TAATCCTGACCA---CACAGACCTTCTA 1823
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND5      A 1821
pig_ND5      A 1821
chicken_ND5 A 1818
duck_ND5     A 1824
          *
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) ND6 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_ND6      TTAATTTCCACGAGTAATTTCTATA-ATAACC-----ACAA-CAC-----CAATTAATAA 48
pig_ND6      TTAATTACCACGAGTAATCTCTATA-ATAACA-----ACAA-CTC-----CAATAAGCAA 48
chicken_ND6  TTAAACCGCCCGAATTGCCCGCCGAGACAACCCACGCACAAGCTCTAGTACAACAAACAA 60
duck_ND6     CTAAACTGCCCGAATAGCCCCCGAGACAACCCCGCACAAGCTCCAACACAACAAATAA 60
          ***      *  *** *      *  *  ***      ***** *      *** *  **

bos_ND6      AGA-----CCACCCAGTTACAATAACTAATCAGGTACCATAACTGTATAAAGC 96
pig_ND6      TGA-----TCAACCAGTAACAATAACTAATCAAGTACCATAACTATATAAAGC 96
chicken_ND6  AGCTAACAAACAAACCTCACCAGCCACCAAAAAACAACCCAACCCACACA--TGAATAAAAC 118
duck_ND6     AGTCAACAAGAGCCCTCAACCTGCAACCAAAAAACATCCCAACCCACAG--CGAATAAAGC 118
          *              ** * * * * * * * * * *      ***      ***** *

bos_ND6      CGCAATCCCTATGGCCTCTTCACTAAAGAACCCAGAATCCCCTGTATCATAAATCACCCA 156
pig_ND6      AGCAATCCCATAGCTTCCTCACTAAAAAACCCCGAATCACCCGTATCATAAATTACTCA 156
chicken_ND6  -----ACCGCAACTCCACTAAA--ATCCAA-----CCGAGCAAAAAGA-----CA 155
duck_ND6     -----ATAGCCACCCCACTAAA--ATCCAG-----CCGTACAGTAAA-----CA 155
          *  ** *  ***** *  **      *  *      *  *      **

bos_ND6      ATCCCCTAAACCATTAAACTCAAACACAACCTCAACTTCTTTATCCTTTAATACATAATA 216
pig_ND6      ATCCCAAGCCATTAAACTTAAAGATAATTTCTACTTCTCTTCTTCAACGCATAATA 216
chicken_ND6  CACCCCG--CCATCAA---CAGTAACCACCCAC-----CTTCAAAAATCAACG 202
duck_ND6     TTCCAACA--CTATCAA---CAGTTACAACCCCTAA-----CCCCAAGACCCAACA 202
          **      *  *** *      *  *  *  *      *  *  **      **

          .
          .
          .
          .

bos_ND6      AAAACTACCATCATACTCCCAAATAAATTA AAAAGACCATCAACCCCAAAAAGGATCCA 385
pig_ND6      AAAACCACCAACATACCCCCCAAATAAATCAAAAACACCATTAACCTAAAAAGACCCA 385
chicken_ND6  AAAACCACCAACATCCCCCTAAATACACCAAAAATAACGCCAAGGAAACAAAAGAAACA 382
duck_ND6     AATACCACCAACATGCCCCCAAATACACCATAAACAGCACCAGGGCTACAAACGAAACC 382
          ** * *  ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND6      CCAAAATTCAATA-CAATTCCACAGCCAACCCACCACTCACAATTAACCCTAACCCCCC 444
pig_ND6      CCAAAATTCAATA-CAATACCACAACCAACTCCACCCTTACAATCAACCCAAGTCCACC 444
chicken_ND6  CCCAAACTCACTAACCAC-CCACATCCTATCACAGAGCTACCACCAACCCACACCC 441
duck_ND6     CCGAGGCTCAATAACCAC-CCACACCCAGCCACAGATGCTAAAACCTAAGCCAACCTACCC 441
          ** *      ***** * *      **      *  *  * * * * * *

bos_ND6      ATAAATAGGTGAAGGTTTCGAAGAAAACCCACAAAACCTATCACGAAAATAACGCTTAG 504
pig_ND6      ATAAATAGGAGAGGGCTTAGAAGAAAAACCAACAAACCAATAACAAAATAGTACTTAA 504
chicken_ND6  ATAATACGGCGAAGGATTAGACGCCACAGCTAAAACCCCGCATAAAAACAAATCCCAAG 501
duck_ND6     ATAGTACGGCGAAGGATTCGATGCTACACCTAAAACACCCACAACAAGCAGATTCTAG 501
          ***      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ND6      AATAAATACAATGTATAGTATCAT 528
pig_ND6      AATAAATGCAATATACATTGTCAT 528
chicken_ND6  AAAAAATCACAAAATAA---GTCAT 522
duck_ND6     AAAAAATACAAAATAA---GTCAT 522
          ** * *      *** *      *****
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) COX1 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_COX1      ---ATGTTTCATTAACCGCTGACTATTCTCAACCAGCCATAAAGATATTGGTACCCTTTTAT 57
pig_COX1      ---ATGTTTCGTAAATCGTTGACTATACTCAACAAACCACAAAGACATCGGCACCCTGTAC 57
chicken_COX1 GTGACCTTCATCAACCGATGATTATTCTCAACCAACCACAAAGACATTGGCACTCTTTAC 60
duck_COX1     GTGACCTTCATCAATCGATGACTATTTTCTACCAATCACAAAGACATCGGTACTCTATAC 60
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

bos_COX1      CTACTATTTGATGCTTGGGCCGGTATAGTAGGAACAGCTCTAAGCCTTCTAATTCGCGCT 117
pig_COX1      CTACTATTTGGTGCCTGAGCAGGAATAGTGGGCACTGCCTTGAGCCTACTAATTCGCGCT 117
chicken_COX1 CTAATTTTCGGGCACATGGGCGGGCATAGCCGGCACAGCACTTAGCCTTCTAATTCGCGCA 120
duck_COX1     CTTATCTTCGGGGCATGAGCCGGAATAATTGGCACAGCACTCAGCCTACTGATCCGGGCA 120
              **  *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

bos_COX1      GAATTAGGCCAACCCGGAACTCTGCTCGGAGACGACCAAATCTACAACGCAGTTGTAACC 177
pig_COX1      GAACTAGGTCAGCCCGGAACCTACTTGGCGATGATCAAATCTATAATGTAATTGTTACA 177
chicken_COX1 GAACTAGGACAGCCCGGAACCTCTTAGGAGACGATCAAATTTACAATGTAATCGTCACA 180
duck_COX1     GAACTAGGCCAGCCAGGGACCCTCCTGGGCGACGACCAAATTTATAACGTGATCGTCACC 180
              ***  *****  *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

bos_COX1      GCACACGCATTTGTAATAATCTTCTTCATAGTAATACCAATCATAATTGGAGGATTCCGT 237
pig_COX1      GCTCATGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTAATACCCATTATGATTGGGGGTTTTGGT 237
chicken_COX1 GCCCATGCTTTCGTCATAATCTTCTTTATAGTTATACCCATCATGATCGGTGGCTTCGGA 240
duck_COX1     GCTCAGCCTTCGTAATAATCTTCTTCATGGTAATGCCCATCATAATTGGAGGGTTTCGGC 240
              **  *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

              .
              .
              .
              .

bos_COX1      TACTCCGACTACCCAGATGCATACACAATATGAAATACTATCTCATCAATAGGCTCATT 1377
pig_COX1      TACTCCGATTATCCTGACGCATACACAGCATGAAATACTATTTCTCAATAGGCTCATT 1377
chicken_COX1 TACTCAGATTACCCAGACGCTACACACTATGAAACACACTATCCTCAATCGGCTCCTTA 1377
duck_COX1     TACTCGGACTACCCTGATGCCTACACACTGTGAAACACCGTCTCCTCTATTGGGTCCCTG 1380
              *****  *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

bos_COX1      ATTTCCCTAACAGCAGTTATACTAATAGTTTTTCATCATCTGAGAAGCATTTCATCTAAA 1437
pig_COX1      ATCTCACTAACAGCAGTGATATTAATAATCTTCATTATCTGAGAAGCATTTCGCATCAAAA 1437
chicken_COX1 ATTTCAATAACAGCCGTAATCATACTCATATTCATCGTCTGAGAAGCCTTCTCAGCAAAA 1437
duck_COX1     ATCTCAATAGTGGCCGTAATCATACTAATGTTTCATCATCTGAGAAGCCTTCTCAGCCAAA 1440
              **  *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

bos_COX1      CGAGAAGTCTTGACTGTAGACTTAACCACGACAAATCTAGAATGATTAACGGATGCCCT 1497
pig_COX1      CGAGAAGTATCTGCAGTAGAACTGACAAGCACAAACCTAGAATGACTACACGGATGTCCT 1497
chicken_COX1 CGAAAAGTACTCCAACCCGAATTAACGCACTAATATCGAATGAATTCATGGCTGCCCA 1497
duck_COX1     CGGAAAGTCTCCAACCCGAATTAACGCCACAAACATTGAGTGAATCCACGGCTGCCCC 1500
              **  *****  *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

bos_COX1      CCACCATATCACACATTTGAAGAACCACCTATGTTAACCTAAAATAA--- 1545
pig_COX1      CCTCCCTATCACACATTTGAAGAACCACATATATCAACCTAAAATAA--- 1545
chicken_COX1 CCCCCATACCACACCTTCGAAGAACCAGCCTTTGTACAAGTGCAAGAAAGG 1548
duck_COX1     CCTCCATACCACACCTTCGAGGAGCCAGCTTTCGTTCAAGTACAAGAAAGG 1551
              **  *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) COX2 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_COX2      ATGGCATATCCCATAACAAGTAGGATTCCAAGATGCAACATCACCAATCATAGAAGAACTA 60
pig_COX2      ATGGCTTACCCTTTCCAAGTAGGCTTCCAAGACGCCACTTCACCCATCATAGAAGAACTC 60
chicken_COX2 ATGGCCAACCACTCCCAACTAGGCTTTCAAGACGCCTCATCCCCATCATAGAAGAGCTC 60
duck_COX2     GTGGCCAACCACTCCCAACTAGGATTCCAAGACGCCTCATCACCATTATAGAAGAACTC 60
              **** * *      ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_COX2      CTTCACTTTTCATGACCACACGCTAATAAATTGTCTTCTTAATTAGCTCATTAGTACTTTAC 120
pig_COX2      CTACACTTTTCACGATCACACCTTAATAATCGTATTCTTAATCAGCTCTTTAGTGTATAT 120
chicken_COX2 GTTGAATTCCACGACCACGCCCTGATAGTCGCACTAGCAATTTGCAGCTTAGTACTCTAC 120
duck_COX2     GTTGAATTCCACGACCACGCTCTGATTGTTGCCTTAGCTATCTGCAGCCTAGTCTTATAC 120
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_COX2      ATTATTTCACTAATACTAACGACAAAGCTGACCCATAACAAGCAGATAGATGCACAAGAA 180
pig_COX2      ATCATTTCACTCATACTAACAACAAAAGCTGACACACACTAGCACAATGGATGCCAAGAA 180
chicken_COX2 CTTCCTAACTCTTATACTTATAGAAAACTATCAT---CAAACACCGTAGATGCCAAGAA 177
duck_COX2     CTCTTAGCCACATGCTAATAGAAAACTATCAT---CCAACGCAGTAGACGCCAAGAA 177
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_COX2      GTAGAGACAATCTGAACCATTCTGCCCGCCATCATCTTAATTCTAATTGCTCTTCCTTCT 240
pig_COX2      GTAGAAACAATTTGAACAATCCTACCCGCTATTATTCTAATTCTTATTGCCCTTCCATCA 240
chicken_COX2 GTTGAACTAATCTGAACCATCCTACCCGCTATTGTCTAGTCTGCTTGCCTCCCTCC 237
duck_COX2     GTAGAATAATCTGAACAATCCTACCCGCCATCGTCTAGTACTCCTCGCCCTCCATCC 237
              ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              .
              .
              .
              .
              .

bos_COX2      CACTCATGAGCTGTGCCCTCTCTAGGACTAAAAACAGACGCAATCCCAGGCCGTCTAAAC 540
pig_COX2      CACTCATGAGCCGTCCCATCCCTCGGTTTAAAAACAGATGCTATCCCAGGACGACTAAAC 540
chicken_COX2 CACTCATGAGCCGTACCCGCCCTCGGGTAAAAACAGACGCAATCCCTGGACGACTAAAT 537
duck_COX2     CACTCATGAGCAGTTCCAACGCTCGGAGTTAAAAACAGATGCAATCCCAGGCCGACTAAAC 537
              ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_COX2      CAAACAACCCTTATATCGTCCCGTCCAGGCTTATATTACGGTCAATGCTCAGAAATTTGC 600
pig_COX2      CAAACAACCTCTAATATCCACACGACCTGGCCTTTATTACGGACAGTGCTCAGAAATCTGT 600
chicken_COX2 CAAACCTCCTTCATCACCCTCGACCAGGAGTGTTTTACGGACAATGCTCAGAAATCTGC 597
duck_COX2     CAAACCTCATTATTACCACCCGGCCTGGGATTTTCTACGGCCAGTGCTCAGAAATCTGC 597
              ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_COX2      GGGTCAAACCACAGTTTCATGCCATTGTCCTTGAGTTAGTCCCCTAAAGTACTTTGAA 660
pig_COX2      GGATCAAACCACAGCTTCATGCCATTGTAAGTGTGCTCCCTAAAGTACTTTGAA 660
chicken_COX2 GGAGCTAACCACAGCTACATACCCATTGTAGTAGAGTCTACCCCTAAAGTACTTTGAA 657
duck_COX2     GGGGCTAACCACAGCTACATGCCTATTGTAGTAGAATCTACCCCTAAAGTACTTTGAA 657
              ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_COX2      AAATGATCTGCGTCAATATTATAA----- 684
pig_COX2      AAATGGTCAACATCAATATTAACAGGTT-- 688
chicken_COX2 GCCTGATCCTCACTACT---GTCATCTTAA 684
duck_COX2     GCCTGATCATCCCTCCTATCGTCATCTTAA 687
              ** * * * * * * * * * * * *
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) COX3 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_COX3      ATGACACACCAAACCTCATGCTTATCATATAGTAAACCCCAAGCCCTTGACCTCTTACAGGA 60
pig_COX3      ATGACCCACCAAACACATGCATACCACATAGTAAACCCCAAGCCCATGACCACTTACCGGA 60
chicken_COX3 ATGGCACACCAAGCACACTCCTACCACATAGTTGACCCCAAGCCCATGACCAATCTTCGGC 60
duck_COX3     ATGGCACACCAAGCACACTCCTACCACATAGTCGACCCCAAGCCCTTGACCAATCTTTGGA 60
*** * ***** * ** * ** * ** ***** ***** ***** * **

bos_COX3      GCTTTGTCTGCCCTCTTAATAACATCCGGCCTAACCATGTGATTTCACTTTAACTCAATG 120
pig_COX3      GCCCTATCAGCCCTTTTAATAACATCAGGCCTAACTATATGATTCCACTTTAACTCTATA 120
chicken_COX3 GCAGCCGCAGCACTACTAACCACCTCTGGCCTAATCATATGGTTCCACTACAGCTCGACC 120
duck_COX3     GCTGCCGCCGCTTACTCACAACCTCAGGGCTAGTCATGTGATTCCACTACAACCTCATCT 120
**          * ** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

bos_COX3      ACCCTGCTAATAATTGGCCTAACACAAATATACTAACAAATATACCAATGATGACGAGAT 180
pig_COX3      CTCTTACTATCTCTAGGACTATTAACCAATACTTTGACAATATACCAATGGTGACGAGAC 180
chicken_COX3 ACCCTACTGACAATAGGCCTCCTCTCTATACTTCTAGTCATGCTGCAATGATGACGAGAC 180
duck_COX3     ATCCTGCTAGCCGCCGGCCTCTTATCAATGCTCCTAGTGATACTCCAATGATGACGGGAC 180
* * * *      * * * *      * *      *      * **      ***** ***** **

bos_COX3      GTTATCCGAGAAAGCACCTTCCAAGGGCACCATAACCCAGCTGTCCAAAAGGCCTCCGT 240
pig_COX3      ATTATTCGAGAGAGCACTTTCCAAGGCCACCACACATCAGTTGTCCAAAAGGCCTACGA 240
chicken_COX3 GTAGTCCGAGAAAGCACCTTCCAGGGCCACCACACCCCAACTGTCCAAAAGGCCTACGA 240
duck_COX3     ATGTCCGAGAGAGCACTTCCAAGGCCACCACACACCTACAGTCCAAAAGGCCTACGA 240
* * ***** ***** ***** * ** * ** * ** * ** * ** * **

.
.
.
.

bos_COX3      ACAGGCTTCCACGGCCTCCACGTCAATCGGATCTACTTTCTTAGCAGTATGCTTACTA 660
pig_COX3      ACAGGGTTTCCACGGGTTGCACGTAATCATCGGATCTACTTTCTTAGCAGTATGCTTACTA 660
chicken_COX3 ACAGGGTTTCCACGGACTACATGTAATCATTGGATCATCCTTTTTAACAGTTTGCCTCCTA 660
duck_COX3     ACCGGATTCCACGGACTCCACGTGATCATCGGATCCACCTTCTAACCCTGCTGCCTCCTC 660
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

bos_COX3      CGCCAATTAATAATTTCAATTTACTTCTAACCACCACTTCGGCTTTGAAGCCGCTGCCTGA 720
pig_COX3      CGACAATAATAATTTCACTTCCACATCCAACCACCACTTCGGCTTTGAAGCCGAGCCTGA 720
chicken_COX3 CGACTAATCAAATTTCACTTCCACACCAACCACCACTTCGGATTTGAAGCAGCAGCCTGA 720
duck_COX3     CGACTAATCAAATTTCACTTCCACATCAGACCACCACTTCGGATTTGAAGCCGAGCCTGA 720
** * * * * ***** ** * ** * * ***** ***** ***** **

bos_COX3      TACTGACATTTTCGTAGACGTAGTCTGACTTTTCTCTATGTTTCTATCTAATGATGAGGC 780
pig_COX3      TACTGACACTTTCGTAGATGTAGTTGACTATTCTTTACGTATCAATCTAATGATGAGGA 780
chicken_COX3 TACTGACACTTTCGTAGACATCATCTGACTCTTCTCTACATATCCATATACTGATGAGGA 780
duck_COX3     TACTGACACTTTCGTAGACGTTATCTGACTATTCTCTATATAACCATCTACTGATGAGGA 780
***** ***** * * ***** ***** * * * ** * ** * **

bos_COX3      T--- 781
pig_COX3      TCCT 784
chicken_COX3 TCTT 784
duck_COX3     TCTT 784
*
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) ATP6 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_ATP6      ATGAACGAAAATTTATTTA-CCTCTTTTATTACCCCTGTAATTTTATAGGTCTCCCTCTCGT 59
pig_ATP6      ATGAACGAAAATCTATTTG-CCTCTTTTATTGCCCCACGATAATAGGACTACCTATTGT 59
chicken_ATP6 ATGAACCTAAGCTTCTTCGACCAATTCTCAAGCCCCTGCC-TACTAGGAATCCCTCTAAT 59
duck_ATP6     ATGAACCTAAGTTTCTTTGACCAATTCTCAAGCCCCACC-TACTTGGCATCCCCCTGAT 59
*****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ATP6      AACCCTTATCGTACTATTCCCAAGCCTACTATTCCCAACATCA---AACCGACTAGTAAG 116
pig_ATP6      CACCTTAATTATATATTTCCCAAGCTTACTATTCCCAACACCC---AAACGACTCATTAA 116
chicken_ATP6 CCTCCCATCACTCCTTCTTCAGCCCTCTACTTCCATCACCAGGAAACCGATGGATCAA 119
duck_ATP6     CCTACTATCCCTGCTCTTCCAGCCCTATTGTTCCCATCCCCAGGCAACCGATGAATCAA 119
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ATP6      CAATCGCTTTGTAAACCCCTCCAACAATGAATACTTCAACTTGTATCAAAAACAAATAATGAG 176
pig_ATP6      TAACCGCACAATCTCGATCCAACAATGATTAATCCAACCTAACATCCAACAAATAATAGC 176
chicken_ATP6 CAACCGCCTCTCCACCATCCAACCTGATTCAACCCACCTAATCACAAAACAATAATAC 179
duck_ATP6     CAACCGACTATCCACCATCCAACCTGTGACTCTACACCTAATCACAAAACAATAATAAT 179
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

.
.
.
.

bos_ATP6      GTTAACAGCTAACATCACTGCAGGACACCTATTAATCACCTAATCGGAGGAGCTACACT 536
pig_ATP6      ACTGACAGCCAACATTACAGCAGGGCACCTATTAATTCATCTAATTGGAGGGGCCACATT 536
chicken_ATP6 CCTAACAGCAAACCTCACAGCTGGTCACCTACTTATCCAACCTTATCTCTACAGCACAAT 539
duck_ATP6     CCTCACAGCTAACCTCACAGCAGGCACCTACTTATCAACTCATCTCCACAGCCTCCAT 539
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ATP6      TGCATAATAAGCATTAGCACTACAACAGCTCTAATTACATTACCATTCTAATCCTACT 596
pig_ATP6      AGCACTACTCAACATCAACACTATAACAGCTTTTATCACATTTACTATCCTCATTCTATT 596
chicken_ATP6 CGCCCTACTACCAATAATGCCATCAATCTCCGCCCTAACGGCACTCATCCTATTCTACT 599
duck_ATP6     CGCACTCATGCCATCCTTCCACAGTATCAATCCTAACAAATAGCCATCCTACTACTCCT 599
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ATP6      AACAAATTCTAGAGTTTGCAGTAGCTATAATCCAAGCCTATGTATTACICTCCTAGTACAG 656
pig_ATP6      AACTATTCTTGAATTTGCAGTAGCTCTGATCCAAGCTTATGTGTTTACACTGCTAGTAAG 656
chicken_ATP6 AACCATCCTAGAAGTGGCAGTAGCAATAATCCAAGCCTACGTCTTCGTCCTCCTCCTAAG 659
duck_ATP6     CACCATCCTAGAAGTAGCAGTGGCCATAATCCAGGCCTACGTTTTTCGTCCTCCTCCTAAG 659
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ATP6      CCTATATCTGCATGACAACACATAA 681
pig_ATP6      CTTATACCTACACGACAATACATAA 681
chicken_ATP6 CCTCTACTTACAAGAAAATATTTAA 684
duck_ATP6     CCTGTACTTACAAGAAAACATCTAA 684
* * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) ATP8 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_ATP8      ATGCCGCAACTAGACACGTCAACATGACTGACAATGATCTTATCAATATTCTTGACCCTT 60
pig_ATP8      ATGCCACAACTAGATACATCCACATGATTTCATTACAATTACATCAATAATTATAACATTA 60
chicken_ATP8 ATGCCCCAATTAACCCAAACCCATGATTCTCCATCATACTCCTAACTTGATTACCTTC 60
duck_ATP8     ATGCCTCAACTCAACCCTGCACCATGATTCTCAATCATAGTCATAACCTGACTAACCCTC 60
*****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ATP8      TTTATCATCTTTCAACTAAAAGTTTCAAAAACACAACCTTTTATC---ACAA-TCCAGAACT 116
pig_ATP8      TTTATTTTATTCCAACTAAAAATCTCAAA---CTACTCATACCC-AGCAAGCCCAGAATC 116
chicken_ATP8 TCTCTGCTTATCCAACCCAAACTTCTTT-----CATTCACTCTAACAAAACAACCCTGC 113
duck_ATP8     GCACTCCTAATCCAGCCAAAACCTGCTAA-----CCTTCACCACAACAATCCCCCATC 113
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ATP8      GACACCAACAAAAATATTAACAACAAAC-ACCCCTTGAGAAAACAAAATGAACGAAAATTT 175
pig_ATP8      AATTGAACTCAAACTCAAAAACATAGC-ACCCCTTGAGAAATAAAATGAACGAAAATCT 175
chicken_ATP8 AA-ACAAA--ATTACA-ACAATAAACCCACCCCTGAACC-----TGACCATGAACCT 163
duck_ATP8     AA-AAAAACCATCACTCATCAACAAAACCCACACCATGAGCC-----TGACCATGAACCT 166
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bos_ATP8      ATTACCTCTTTTATTACCCCTGTAA--- 201
pig_ATP8      ATTTGCCTCTTTTATTGCCCCACGATAA 204
chicken_ATP8 AA----- 165
duck_ATP8     AA----- 168
*
    
```

- 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) Cyt B 유전자의 alignment 결과

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

bos_CYTB      ATGACT---AACATTCGAAAGTCCCACCCACTAATAAAAAATTGTAAACAATGCATTCATC 57
pig_CYTB      ATGACC---AACATCCGAAAATCACACCCACTAATAAAAAATTATCAACAACGCATTCATT 57
chicken_CYTB  ATGGCACCCAACATTCGAAAATCCCACCCCTACTAAAAATAATTAACAACCTCCCTAATC 60
duck_CYTB     ATGGCCCCAACATCCGCAAATCCCACCCCTACTAAAAATAATCAACAACCTCCCTAATC 60
          *** *      ***** ** ** * ** ***** ** * ***** * * **

bos_CYTB      GACCTTCCAGCCCATCAAACATTCATCATGATGAAATTTTCGGTTCCTCCTGGGAATC 117
pig_CYTB      GACCTCCCAGCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCTCTTAGGCATC 117
chicken_CYTB  GACCTCCCAGCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTCGGCTCCTATTAGCAGTC 120
duck_CYTB     GACCTTCCCGCACCTCTAATATCTCTGCCTGATGAAACTTCGGATCTCTGCTCGCCATC 120
          ***** ** ** * ** * ** * ** * * ***** ***** ** ** * * **

bos_CYTB      TGCCTAATCCTACAAATCCTCACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACATCCGACACA 177
pig_CYTB      TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA 177
chicken_CYTB  TGCCTCATGACCCAAATCCTCACAGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACACA 180
duck_CYTB     TGCCTGGCCACACAAATCCTCACAGGCCTCCTACTGGCTATGCACTACACCGCAGACACA 180
          *****      ***** ** ***** * * ** * ** * ** ***** * *****

bos_CYTB      ACAACAGCATTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTGAACTACGGCTGAATCATC 237
pig_CYTB      ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATTTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 237
chicken_CYTB  TCCTTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCACACTTGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTCATC 240
duck_CYTB     TCCTTGCTTTCTCCTCAGTAGCCAACACATGCCGAAACGTCCAATATGGCTGACTCATC 240
          *   ** ***** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

          .
          .
          .

bos_CYTB      ACCACTCAGCCAATGCCTATTCTGAGCCCTAGTAGCAGACCTATTGACACTCACATGAAT 1013
pig_CYTB      ACCACTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAAT 1013
chicken_CYTB  ACCACTCTCCAAACCCTATTCTGACTTCTAGTAGCCAACCTTCTTATCCTAACCTGAAT 1016
duck_CYTB     GCCGCTCTCCAACTCCTATTCTGAACACTAGTGCCAACCTCCTCGTCTAACATGAGT 1016
          ** **      *** ***** ***** ** ***** *   ** ** ** **

bos_CYTB      TGGAGGACAACCAGTCGAACACCCATATATCACCATCGGACAACCTAGCATCTGTCTTATA 1073
pig_CYTB      TGGAGGACAACCCGTAGAACACCCGTTTCATCATCATCGGCCAACCTAGCCTCCATCTTATA 1073
chicken_CYTB  CGGAAGCCAACCAGTAGAACACCCCTTCATCATCATTGGCCAAATAGCATCCCTCTCTTA 1076
duck_CYTB     GGAAGCCAACCTGTGGAACACCCATTTCATCATCATCGGGCAACTCGCATCAATTACTTA 1076
          *** * ***** ** ***** *   ***** ** ***** * ** ** * **

bos_CYTB      CTTTCTCCTCATCCTAGTGCTAATACCAACGGCCGGCACAATCGAAAACAAATTACTAAA 1133
pig_CYTB      CTTCTAATCATTCTAGTATTGATACCAATCACTAGCATCATCGAAAACAAACCTATTAAA 1133
chicken_CYTB  CTTACCATCCTACTTATCCTCTTCCCACAATCGGAACACTAGAAAACAAATACTCAA 1136
duck_CYTB     CTTACCATCCTCCTATTCTTTCCCTGCCGTAAGCGCCCTAGAAAACAAATGCTTAA 1136
          ***      ** * ** * * * ** *   *   ***** * * **

bos_CYTB      ATGAAGA 1140
pig_CYTB      ATGAAGA 1140
chicken_CYTB  CTAATAA 1143
duck_CYTB     CTGCTAA 1143
          *   *
    
```

○ 주요 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) 조직 시료에서 Ethanol method를 통하여 DNA를 추출 하였다. 추출된 DNA는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer(Thermo, USA)로 흡광도를 측정하였고, A₂₆₀/A₂₈₀ 1.8 이상인 DNA를 50 ng/ μ l로 희석하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였음.

○ mtDNA내 14개의 유전자 중, 유전적 변이가 비교적 빠르다고 알려진 D-loop, Cyt_B 영역에서 축종별 특이적 서열을 바탕으로 하여 Primer3 프로그램을 사용하여 primer를 제작하였음 (표1).

표 1. 축종별 식별 마커 개발을 위한 primer 조건

No.	Name	Sequence(5'→3')	Tm
1	Bos taurus-1F	AACACGCCATACACAGACC	54.4
2	Bos taurus-2F	TCAAGCACACACCCTGTAGC	57.5
3	Bos taurus-3F	GCATTCTCCTCTGTTACCCATATC	58.7
4	Bos taurus-4F	GCCATAGTCCACCTACTATTCTC	60.4
5	Bos taurus-5F	GGGCCCTCTTACTAATTCTAGCTC	60.4
6	Bos taurus-6F	ACCCGAGTGATACTTCTTATTTGC	57.0
7	Bos taurus-7F	TTCTCCTCTGTTACCCATATCTGC/	58.7
8	Bos taurus-8F	ATACGCAATCTTACGATCAATCC	54.9
9	Bos taurus-1R	TATGCTGGTGCTCAAGATGC	53.4
10	Bos taurus-2R	AGTGCGTCGGCTATTGTAGG	57.5
11	Bos taurus-3R	CTGATAAGAGGTTGGTGATGACTG	58.7
12	Bos taurus-4R	CGTAAGATTGCGTATGCAAATAAG	55.3
13	Bos taurus-5R	TAGTTGTCCGATGGTGATATATGG	57.0
14	Bos taurus-6R	GAGCTAGAATTAGTAAGAGGGCCC	60.4
15	Bos taurus-7R	GGATTGATCGTAAGATTGCGTAT/	54.9
16	Sus Scrofa-1F	TCGTGCATTAATTGCTAGTCC	52.0
17	Sus Scrofa-2F	CACACCCTATAACGCCTTGC	54.4
18	Sus Scrofa-3F	ACGAAAGCAGGCACTTACCC	57.5
19	Sus Scrofa-4F	CTATAACGCCTTGCCAAACC	55.4
20	Sus Scrofa-5F	CATACACGTGCGTACACGTG	55.4
21	Sus Scrofa-6F	CCTATAACGCCTTGCCAAAC	55.4
22	Sus Scrofa-7F	CATCAGTTACACACATTTGTCGAG	57.0
23	Sus Scrofa-8F	CAGCTATCCCTTATATCGGAACAG	58.7
24	Sus Scrofa-9F	GGACATAACGTACATACACGTGC	58.4
25	Sus Scrofa-10F	GACATAACGTACATACACGTGCG	58.4
26	Sus Scrofa-11F	CATAACGTACATACACGTGCGT	56.3
27	Sus Scrofa-12F	TATTCGCTATCTACATGCAAACG/	54.9
28	Sus Scrofa-13F	CAGCTATCCCTTATATCGGAACA	56.6
29	Sus Scrofa-14F	CCTTATATCGGAACAGACCTCGT	58.4
30	Sus Scrofa-15F	TTATCCTGCCATTCATCATTACC	54.9

표 1. 계속

No.	Name	Sequence(5'→3')	Tm
31	Sus Scrofa-1R	TGTCCCGTAACCATTGACTG	52.9
32	Sus Scrofa-2R	AGTGCCGTGCTTTCGTAGCAC	54.3
33	Sus Scrofa-3R	GCTGTGAGGCTCATCTAGGC	59.5
34	Sus Scrofa-4R	GGTTTGCAAGGCGTTATAG	55.4
35	Sus Scrofa-5R	GTTTGGCAAGGCGTTATAGG	55.4
36	Sus Scrofa-6R	GCAAGGCGTTATAGGGTGTG	57.5
37	Sus Scrofa-7R	CTGTTCCGATATAAGGGATAGCTG	58.7
38	Sus Scrofa-8R	GTCTATGTCTGATGAGATTCCGGT	58.7
39	Sus Scrofa-9R	GGCGTTATAGGGTGTGTAGAGC	60.0
40	Sus Scrofa-10R	TGTTCCGATATAAGGGATAGCTG/	56.6
41	Sus Scrofa-11R	ACGAGGTCTGTTCCGATATAAGG	58.4
42	Sus Scrofa-12R	GGTAATGATGAATGGCAGGATAA	54.9
43	Sus Scrofa-13R	GTCTATGTCTGATGAGATTCCGG	58.4
44	Gallus-1F	CGGGCATTAACTTATATTCCAC	54.2
45	Gallus-2F	CCACATTTCTCCCAATGTCC	53.7
46	Gallus-3F	TATGCTCGCCGTATCAGATG	55.4
47	Gallus-4F	GGTTATGCTCGCCGTATCAG	57.5
48	Gallus-5F	CCATTTACCCATACTACTCCTTC	58.7
49	Gallus-6F	TCTACAAGGAAACCTGAAACACAG	57.0
50	Gallus-7F	CCTCTACAAGGAAACCTGAAACAC	58.7
51	Gallus-8F	CTCCTACCTCTACAAGGAAACCTG	60.4
52	Gallus-9F	ATCCATTTACCCATACTACTCC/	57.0
53	Gallus-10F	ATGCATAACTCCTGAACCTTCTCAC	57.3
54	Gallus-11F	CATGCATAACTCCTGAACCTTCTC	57.0
55	Gallus-12F	ATCAAGCCACCTAACTATGAATGG	57.0
56	Gallus-1R	GCGATCACGGACTAAAGAGG	53.6
57	Gallus-2R	GCGATCACGGACTAAAGAGG	53.6
58	Gallus-3R	ACCATAACCAAATGCGATCC	53.4
59	Gallus-4R	TATGTCCGACAAGCATTAC	53.4
60	Gallus-5R	CGCGATCACGGACTAAAGAG	57.5
61	Gallus-6R	TTCAGGTTAGGATAAGAAGGTTGG/	57.0
62	Gallus-7R	GAAGGAGTAGTATGGGTGAAATGG	58.7
63	Gallus-8R	CGACAAGCATTCACTAAATAGCAC	57.0
64	Gallus-9R	GAAGATAATCCACAGATGACTTCG	57.0
65	Gallus-10R	AAATATGTCCGACAAGCATTAC	54.9
66	Anas-1F	ATGCACGGACTAAACCCATC	53.6
67	Anas-1R	CACAGATGCCACTTTGAAGG	52.7
68	Anas-2F	GAATAGCCTAATAATGCTCTCAGGAC/	55.1
69	Anas-2R	TGAGTAATGGGTGGGTGGAG	54.3
70	Anas-3F	AATGGACCCAGAGTGAATGC	55.4
71	Anas-3R	CACAGATGCCACTTTGAAGG/	55.4
72	Anas-4F	TCTCCACCCACCCATTACTC	57.5
73	Anas-4R	CTTTGAAGGGCAAGGAGAGG	57.5

○ PCR 반응에 이용되는 각 시약들의 조성

DNA	1 μ l (50 ng)
Primer(F,R)	2 μ l
10X Buffer	2.5 μ l
dNTP mix	1.2 μ l
Taq	0.1 μ l
DW	18.2 μ l

- 유전자 증폭조건은 95°C에서 5분간 처리한 후 94°C에서 30초, 66°C에서 30초, 72°C에서 30초를 35 cycle로 하여 반복하였다. 그리고 72°C에서 5분 후 8°C에서 과정을 종료하였음.

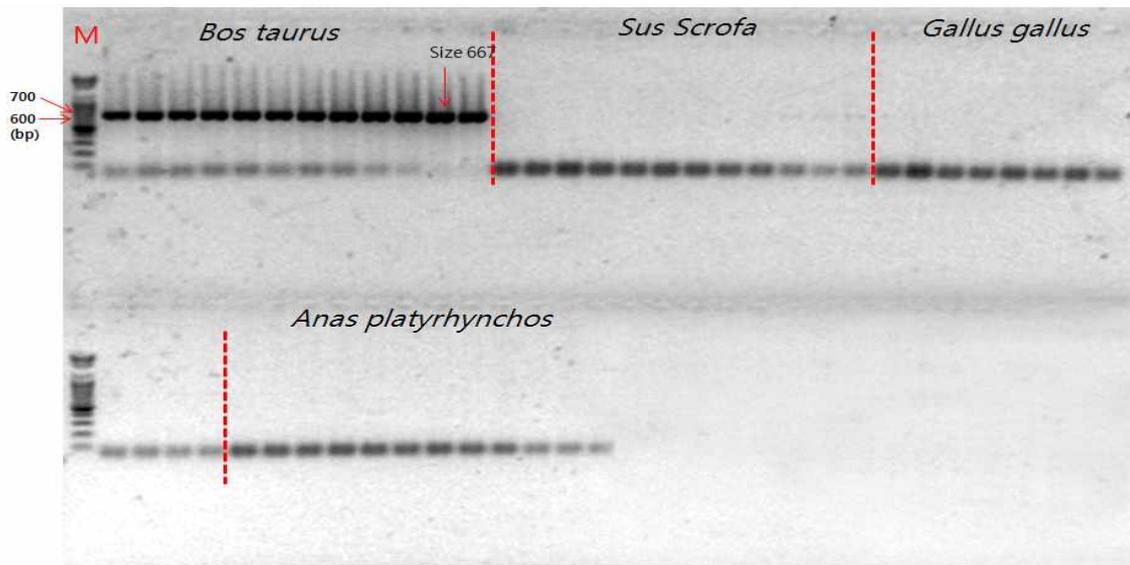
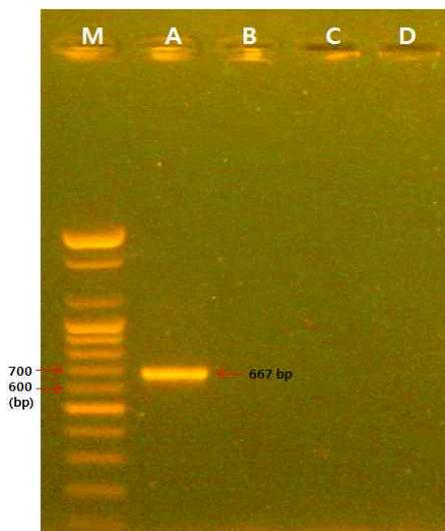


그림 1. 소의 Bos taurus 7F-7R primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) gradient PCR 전기영동 결과.



M: 100 bp ladder, A: 소, B: 돼지, C: 닭, D: 오리

그림 2. 소의 Bos taurus 7F-7R primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) 전기영동 결과.

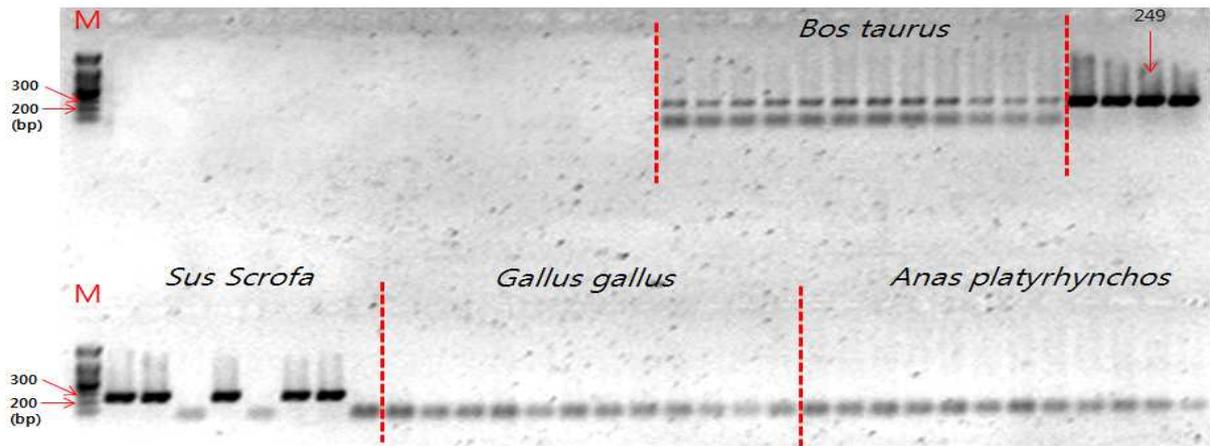
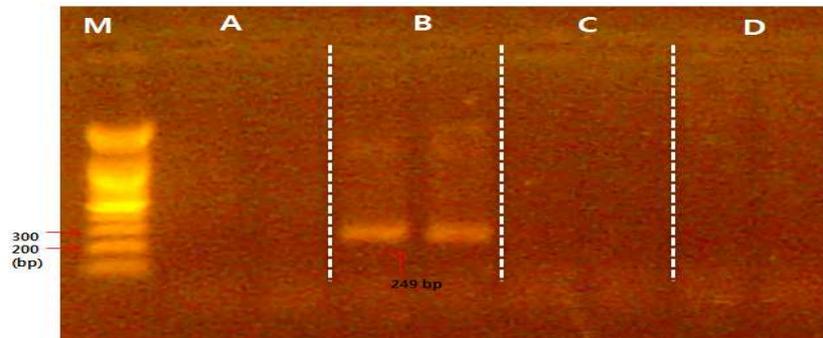


그림 3. 돼지의 *Sus scrofa* 11F-5R primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) gradient PCR 전기영동 결과.



M: 100 bp ladder, A: 소, B: 돼지, C: 닭, D: 오리

그림 4. 돼지의 *Sus scrofa* 11F-5R primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) 전기영동 결과

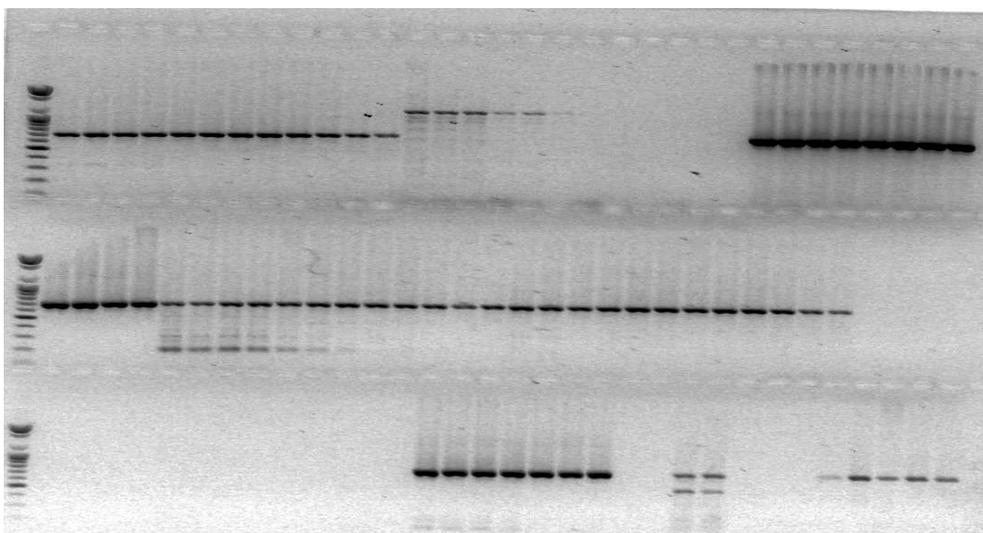
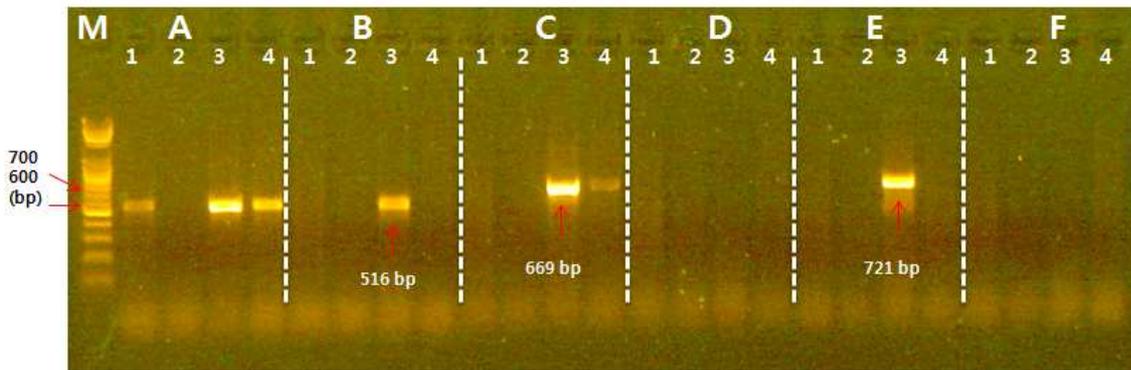


그림 5. 닭의 *Gallus* 2F-4R primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) gradient PCR 전기영동 결과.



M: 100 bp ladder, A: Gallus 4F-4R, B: Gallus 4F-4R(DMSO), C: Gallus 2F-3R, D: Gallus 2F-3R(DMSO) E: Gallus 2F-4R, E: Gallus 2F-4R(DMSO), 1: 소, 2: 돼지, 3: 닭, 4: 오리
 그림 6. 닭의 Gallus 4F-4R, 2F-3R, 2F-4R primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) 전기영동 결과.

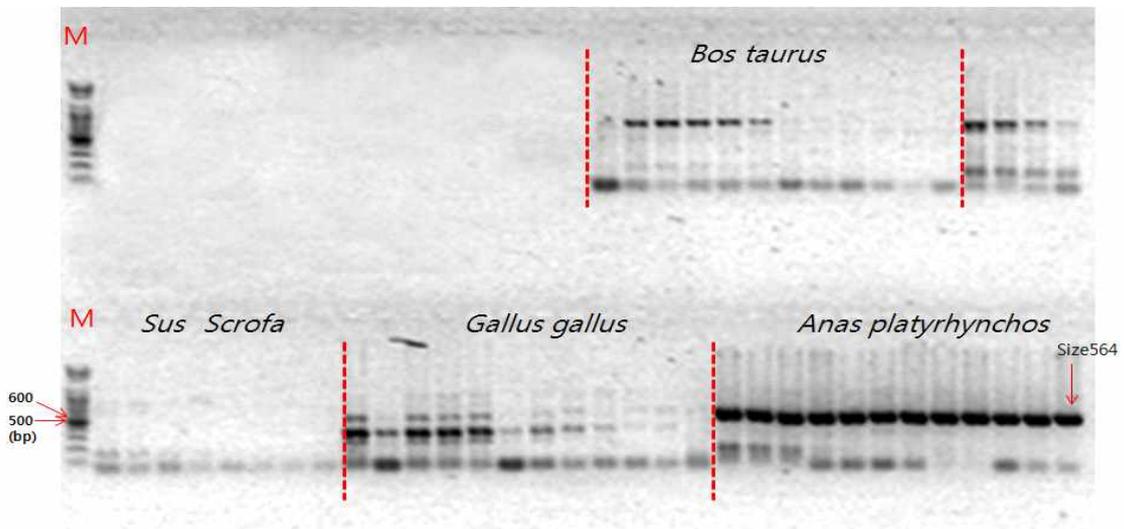
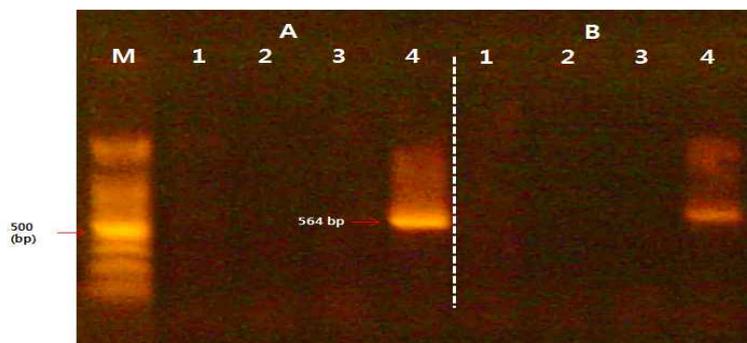


그림 7. 오리의 Anas 2F-1R primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) gradient PCR 전기영동 결과



M: 100 bp ladder, A: Anas 2F-1R, B: Anas 2F-1R(DMSO), 1: 소, 2: 돼지, 3: 닭, 4: 오리
 그림 8. 오리의 Anas 2F-1R primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) 전기영동 결과

○ 최종적으로 소(*Bos taurus* 7F-7R primer, 667 bp), 돼지(*Sus scrofa* 11F-5R primer, 249 bp), 닭(*Gallus* 2F-4R primer, 721 bp), 오리(*Anas* 2F-1R primer, 546(564) bp)를 종 특이적이 primer 로 선정 후 분쇄육(햄, 소시지, 돈까스, 패티 등)에서 DNA를 추출하여 multiplex PCR의 조건을 확립하여 분쇄육 판별 및 종 식별을 위한 마커로 활용 (그림 9).

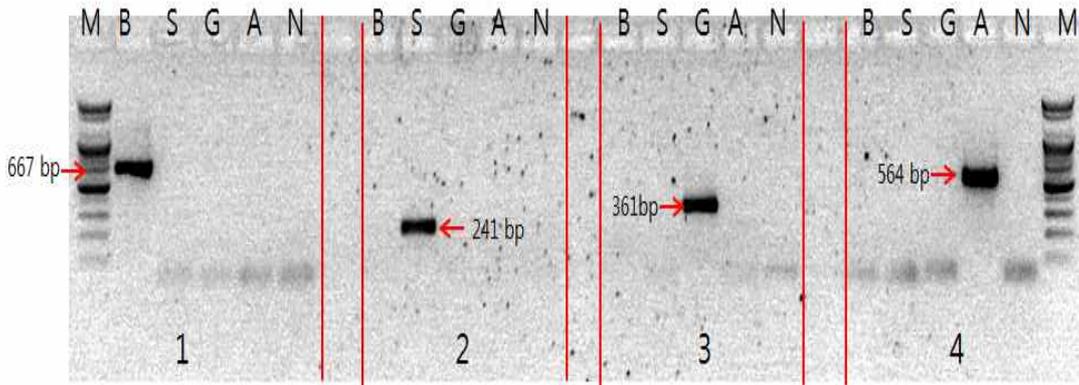


그림 9. 소, 돼지, 닭, 오리의 primer를 이용한 축종별(소, 돼지, 닭, 오리) single PCR 전기영동 결과. B, *Bos taurus*; S, *Sus scrofa*; G, *Gallus gallus*; A, *Anas platyrhynchos*; 1, cattle; 2, pig; 3, chicken; 4, duck primers. (M: 100 bp DNA ladder)

○ multiplex PCR 조건 확립

- 4쌍의 프라이머를 이용한 multiplex PCR 증폭에 최적의 annealing 온도는 60℃로 설정 후 multiplex PCR 조건으로 95℃에서 15분간 처리한 후 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초를 35 cycle로 하여 반복하였다. 그리고 65℃에서 30분간 신장 후 8℃에서 과정을 종료.

DNA	1.0 μ l (100 ng)
10X buffer	1.5 μ l
dNTPs	1.2 μ l
MgCl ₂	1.1 μ l
Foward and Reverse primer mix*	8.0 μ l
Taq DNA polymerase (Bioneer hot start taq)	0.4 μ l
3 DW	10.2 μ l

* Each cattle, pig, chicken, duck primer 1 μ l

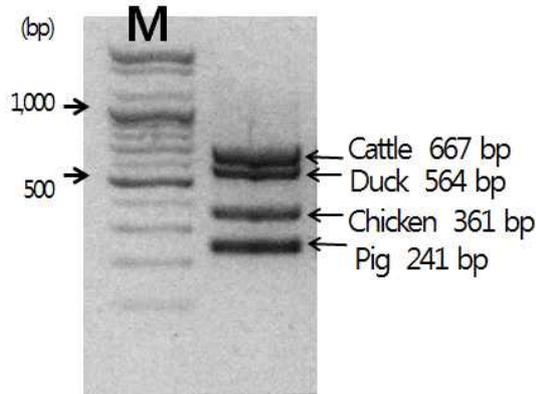


그림 10. 축종 판별을 위한 특이적 primer set를 이용한 multiplex PCR 결과. M, 100 bp ladder (bioneer, Korea)

○ 각각의 시료에 축종 특이적 프라이머를 이용하여 PCR 한 결과와 동일하게 multiplex PCR에서도 증폭됨을 확인할 수 있었고, 4개 축종을 한 번에 증폭 할 수 있는 multiplex PCR 조건을 확립 (그림 10).

▶ 시판 혼합 육제품에 대한 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템 검증

- 시판 중인 혼합 육제품 52개를 대상으로 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템 검증 실시
 - 프레스햄(Pressed ham, H), 소시지(Sousage, S), 패티(Patties, P), 떡갈비(Tteokgalbi, T), 캔햄(Canned ham, C) 등으로 5분류.
 - 실험에 사용된 52개 제품 (표2) 중 오리가 포함된 제품은 없었고, 대부분이 돼지를 포함한 제품으로 확인.

표 2. 시판 혼합 육제품의 제품명 및 성분표

구분	분류	회사	제품명	소	돼지	닭	오리
H1	프레스 햄	동원	본엠통그릴햄		91.73		
H2		롯데	엔네이쳐무안양파		91.35		
H3		CJ	더건강한햄의성마늘		89.28		
H4		CJ	더건강한햄		90		
H5		농협목우촌	주부구단 살코기햄		91.74		
H6		롯데	의성마늘햄		90.02		
H7		e-mart	스모크햄		53.59		25.82
H8		e-mart	맛있는 햄		91.59		
S1	소시지	CJ	그릴비엔나		93.1		
S2		동원	텔립비엔나		85.79		
S3		e-mart	비엔나소시지		50.72		30.56
S4		농협목우촌	주부구단비엔나		93.07		
S5		롯데	롯데비엔나		*		

표 2. 계속

구분	분류	회사	제품명	소	돼지	닭	오리
S6		롯데	롯데비엔나		84.95		
S7		롯데	굽기쉬운비엔나		90		
S8		청정원	참잘만든순살비엔나		*		
S9		동원	통그릴비엔나		91.73		
S10		청정원	건강생각		91.13		
S11		대림선	캠프비엔나		94.66		
S12		동원	그릴후랑크		86.08		
S13		롯데	엔네이쳐부드러운후랑크		90.03		
S14	소시지	롯데	의성마늘후랑크		86.35		
S15		청정원	건강생각		*		
S16		농협목우촌	프라임꼬치구이		90		
S17		e-mart	햇도그소시지		91.52		
S18		한성기업	비바크부어스트		90.64		
S19		한성기업	도이치부어스트		92.09		
S20		동원	본엠통그릴두툽후랑크		90.68		
S21		CJ	그릴불고기		90.13		
S22		CJ	더건강한 그릴비엔나		94.67		
S23		CJ	더건강한그릴후랑크		93.36		
P1	패티	e-mart	양념한우너비아니	*	*		
P2		e-mart	스테이크	*	*		
P3		e-mart	등심돈까스		*		
P4		e-mart	치킨까스			*	
P5		e-mart	안심까스		*		
P6		e-mart	치즈인수제돈까스		8		
P7		하림	굿모닝패티		45.62	29.2	
T1	떡갈비	새아침	신임떡정남작떡갈비	33.43	45.59	4.76	
T2		청정원	저며낸 통살산적	9.93	53.66		
T3		롯데	롯데전통떡갈비	10.28	51.42		
T4		e-mart	이마트 떡갈비		76.24		
T5		CJ	백설너비아니		75.91		
T6		롯데	고기산적		61.91	4.12	
T7		롯데	의성마늘떡갈비		59.43	*	
C1	캔햄	동원	리챔(녹차숙성)		95.08		
C2		신송	라이트햄		91.11		
C3		CJ	SPAM		95.76		
C4		CJ	더 건강한 햄		95.7		
C5		e-mart	제주 흑돼지 햄		87.48		
C6		청정원	우리팜텔리		95.2		
C7		하림	런천미트		28.8	58	

* 함량 미표기

○ 시판 중인 혼합 육제품 52개를 대상으로 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템 검증 결과(표3).

표 3. 시판 혼합 육제품 Multiplex PCR 원료육 판별 시스템 검증 결과

Type	분류	회사	제품명	Label*	Result*
H1	프레스햄	동원	본엠통그릴햄	P	P
H2		롯데푸드	엔네이쳐무안양파	P	P, K
H3		CJ	더건강한햄의성마늘	P	P
H4		CJ	더건강한햄	P	P
H5		농협목우촌	주부구단 살코기햄	P	P
H6		롯데	의성마늘햄	P	P
H7		e-mart	스모크햄	P, K	P, K
H8		e-mart	맛있는 햄	P	P
S1	소시지	CJ	그릴비엔나	P	P
S2		동원	델립비엔나	P	P, K
S3		e-mart	비엔나소시지	P, K	P, K
S4		농협목우촌	주부구단비엔나	P	P
S5		롯데햄	롯데비엔나	P	P
S6		롯데햄	롯데비엔나	P	P, K
S7		롯데푸드	굽기쉬운비엔나	P	P
S8		청정원	참잘만든순살비엔나	P	P
S9		동원	통그릴비엔나	P	P
S10		청정원	건강생각	P	P
S11		대림선	캠프비엔나	P	P
S12		동원	그릴후랑크	P	P
S13		롯데푸드	엔네이쳐부드러운후랑크	P	P
S14		롯데햄	의성마늘후랑크	P	P
S15		청정원	건강생각	P	P
S16		목우촌	프라임꼬치구이	P	P
S17		e-mart	햇도그소시지	P	P
S18		한성기업	비마크부어스트	P	P
S19		한성기업	도이치부어스트	P	P
S20		동원	본엠통그릴두툼후랑크	P	P
S21		CJ	그릴불고기	P	P
S22		CJ	더건강한 그릴비엔나	P	P
S23		CJ	더건강한그릴후랑크	P	P
P1	패티	e-mart	양념한우너비아니	C, P	C, P
P2		e-mart	스테이크	C, P	C, P
P3		e-mart	등심돈까스	P	P
P4		e-mart	치킨까스	K	K
P5		e-mart	안심까스	P	P
P6		e-mart	치즈인수제돈까스	P	P
P7		하림	굿모닝패티	P, K	P, K

표 3. 계속

Type	분류	회사	제품명	Label*	Result*
T1	떡갈비	새아침	신임꺼정납작떡갈비	C, P	C, P, K
T2		청정원	저며낸 통살산적	C, P	C, P
T3		롯데햄	롯데전통떡갈비	C, P	C, P
T4		e-mart	이마트 떡갈비	P	P, K
T5		CJ	백설너비아니	P	P
T6		롯데햄	고기산적	P, K	P, K
T7		롯데햄	의성마늘떡갈비	P, K	P, K
C1	캔햄	동원	리챔(녹차숙성)	P	P
C2		신송	라이트햄	P	P
C3		CJ	SPAM	P	P
C4		CJ	더 건강한 햄	P	P
C5		e-mart	제주 흑돼지 햄	P	P
C6		청정원	우리팜델리	P	P
C7		하림	런천미트	P, K	P, K

* Cattle : C, Pig : P, Chicken : K, Duck : D

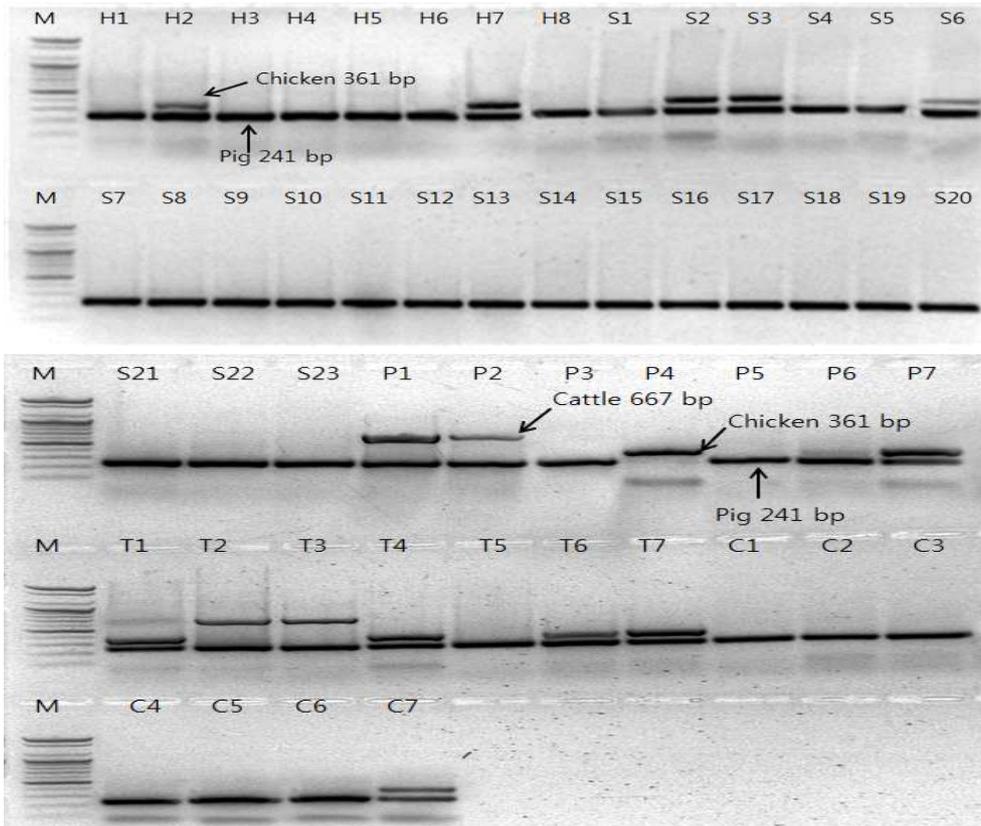


그림 11. 육제품의 Multiplex PCR 전기영동 결과. Pressed ham, H1-H8; Sausage, S1-S23; Patties, P1-P7; Tteokgalbi, T1-T7; Canned ham, C1-C7; Using primer set. (M, 100 bp ladder)

○ 시판 중인 혼합 육제품을 구매하여 DNA를 추출하고 확립된 multiplex PCR 방법에 따라 실험을 수행 결과, 일부 제품 (5개; H2, S2, S6, T1, T4)에서 제품 성분표와 다르게 닭이 포함 된 것을 확인.

- 오리의 경우 모든 제품에서 증폭되지 않음.

○ 시판 육제품 오폭기 가능성의 검증

- 시판 육제품에 대해 축종 특이적 primer를 각각 이용하여 증폭한 결과와 multiplex PCR을 수행한 결과, 5개 제품(H2, S2, S6, T1, T4)에서 제품 성분표와 일치하지 않는 결과를 확인.

- 이들 제품은 모두 성분표와 달리 닭이 포함되어있는 것으로 확인 (그림 12, 13).

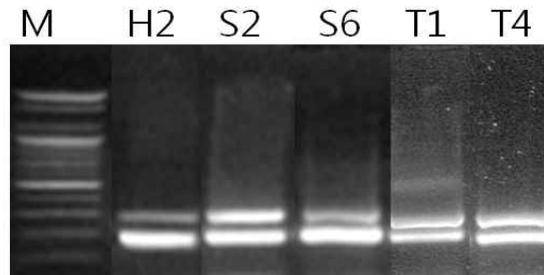


그림 12. 오폭기의 가능성이 있는 5개 제품의 multiplex PCR 전기영동 결과.

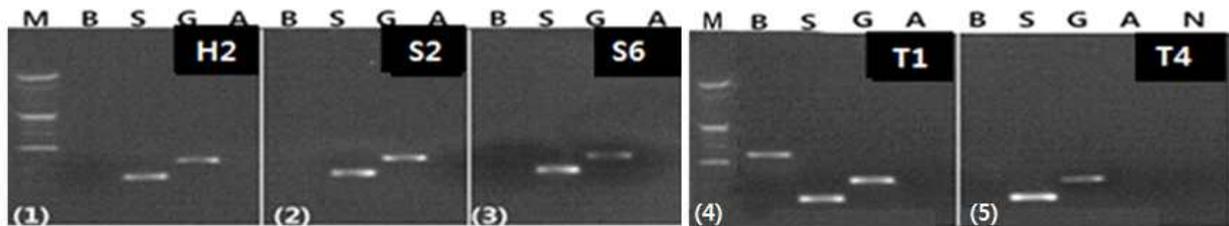


그림 13. 오폭기의 가능성이 있는 5개 제품의 single PCR 전기영동 결과. (1) Pressed Ham 2; (2) Sausage 2; (3) Sausage 6; (4) Tteokgalbi 1; (5) Tteokgalbi 4; Using primer set, B, Cattle primer; S, Pig primer; G, Chicken primer; A, Duck primer; M, 100 bp ladder(bioneer, Korea).

○ 문제가 된 5개 제품을 재구매하여 반복 실험을 실시.

- 이들 중, T1 시료의 경우 처음 구매했을 때와 비교하여 제품 포장에 표기된 성분표의 디자인과 내용이 바뀐 것을 확인.

- T1을 처음 구입했을 당시, 제품 성분표에는 <돼지갈비 50.35%, 소고기 33.43%>로 표기되어 있었지만, 재 구매 했을 때 <돼지갈비 45.59%, 소고기 33.43%, 닭고기 4.76%>으로 바뀐 것을 확인 (그림 14, 15).



그림 14. T1 샘플의 바뀐 성분표기.

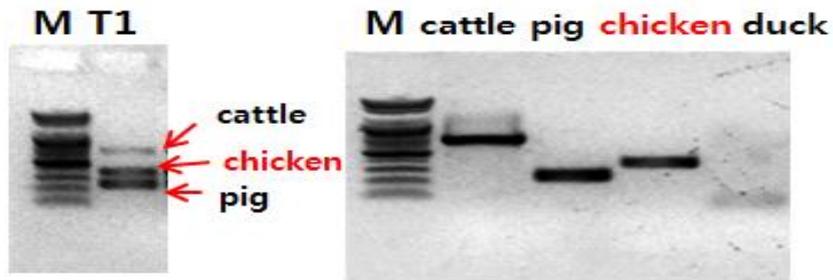


그림 15. T1에 대한 multiplex와 single PCR한 결과.

- 재구매한 T1 제품으로 multiplex PCR과 single PCR을 수행한 결과, 마찬가지로 닭이 검출되었음.
- 이것은 원래 닭고기가 포함되어 있었으나 표기를 나중에 다시 한 것으로 보이며, 따라서 본 연구팀에서 개발한 multiplex PCR 원료육 판별 시스템이 정확한 판별력을 가진다는 분석결과로 해석할 수 있음.

▶ Real-Time PCR 법을 이용한 원료육 판별 시스템 구축

- 축종의 함량이 얼마나 포함되어 있는지 확인하기 위해 정량 분석을 위한 Real-time PCR 조건을 확립하기 위한 실험을 실시.

DNA	1 μ l (50 ng)
Foward primer	0.5 μ l (500nMol)
Reverse primer	0.5 μ l (500nMol)
iQ™ SYBR® Green supermix	5 μ l
DW	3 μ l

- 정량 분석을 위한 Real-time PCR 분석에서 증폭조건은 95°C에서 3분간 처리한 후 94°C에서 10초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 1 cycle로 하여 20cycle 반복하였다. Melt curve 분석은 60°C에서 95°C까지 0.5°C씩 0.05°C 마다 온도를 올라가게 설정하여 각 primer마다 특이적인 온도를 나타내게 하였음.

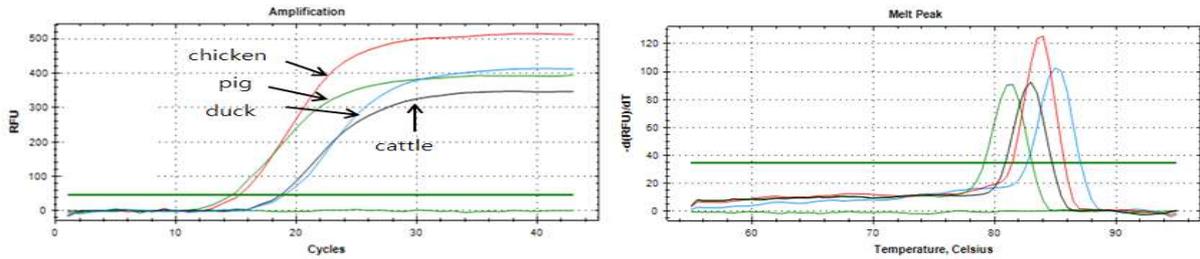


그림 16. qPCR 분석을 통한 축종별 증폭곡선과 melt peak.

- 원료육 50ng을 이용하여 Real-time PCR을 수행한 결과, 축종별 특이적인 cycle quantification(Cq) 값과 melt curve를 확인 할 수 있었다. 각 시료의 녹는 온도는 소 83°C, 돼지 81.5°C, 닭 84°C, 오리 85°C였으며, Cq 값은 18.7, 14.67, 15.28, 19.06 이었음.

- 각 축종의 standard curve를 작성하기 위해 소, 돼지, 닭의 원료육 DNA를 100, 50, 25, 10 ng/μl로 희석하고 동일한 조건에서 10번 씩 반복하여 Real-time PCR 분석을 실시하였다. 아래 그림 17은 각 축종별 희석된 원료육의 농도별 증폭곡선과 melt curve를 보여주고 있음.

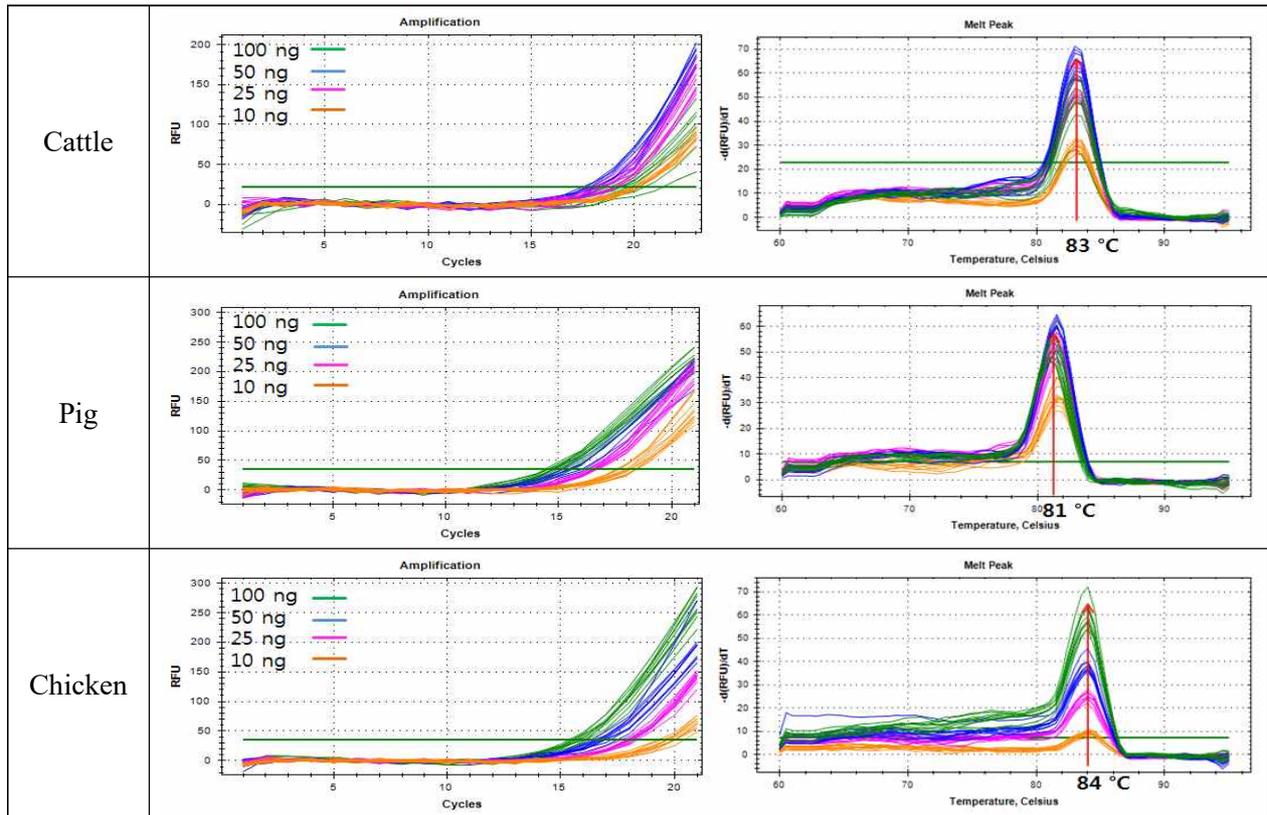


그림 17. 소, 돼지, 닭의 농도에 따른 증폭곡선과 melt peak.

- 돼지와 닭의 경우, 증폭곡선에서 threshold line을 기준으로 보았을 때 희석된 원료육의 농도가 높을수록 cycle 값이 낮아짐을 알 수 있음. 즉, 농도가 높을수록 Cq 값은 낮아짐.
- 앞서 확인한 것과 같이 각 시료의 녹는 온도는 소 83°C, 돼지 81.°C, 닭 84°C로 확인되었음.

표 4. 각 축종별 농도에 따른 Cq 값 변화

축종	평균 농도 (ng/μl)			
	10	25	50	100
Cattle	19.65	18.25	17.23	18.35
Pig	17.51	16.41	15.43	14.47
Chicken	19.21	18.21	17.25	16.11
Duck	20.12	18.51	17.44	17.13

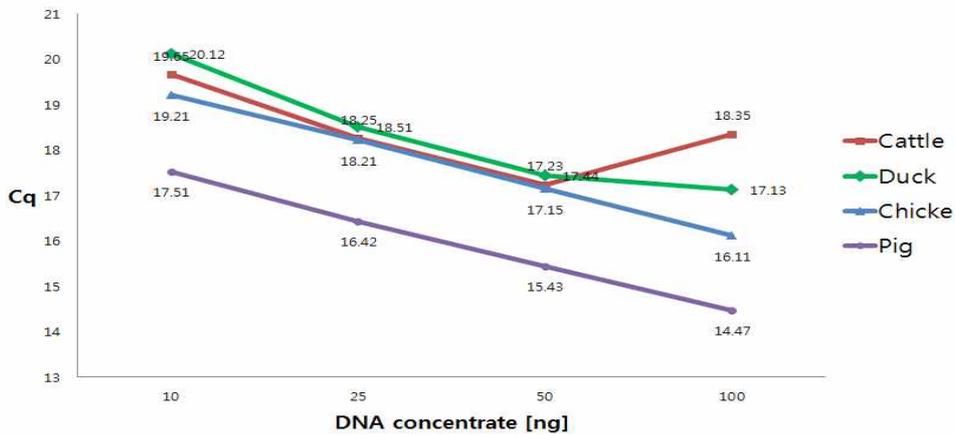


그림 18. 축종별 희석한 원료육 DNA에 따른 평균 cycle quantification의 변화

- DNA 농도에 따른 Cq값을 그래프로 나타냈을 때 직선으로 나타나는 것이 가장 이상적이며 DNA 농도가 높을수록 더 빠른 증폭곡선이 나타나기 때문이다. 소, 돼지, 닭, 오리의 원료육 DNA를 100, 50, 25, 10 ng/μl 별로 Real-time PCR 분석을 수행한 결과, 돼지, 닭, 오리는 농도가 낮아질수록 Cq값이 높게, 농도가 진할수록 Cq값이 낮게 나타나 이상적인 결과를 보여주고 있음.

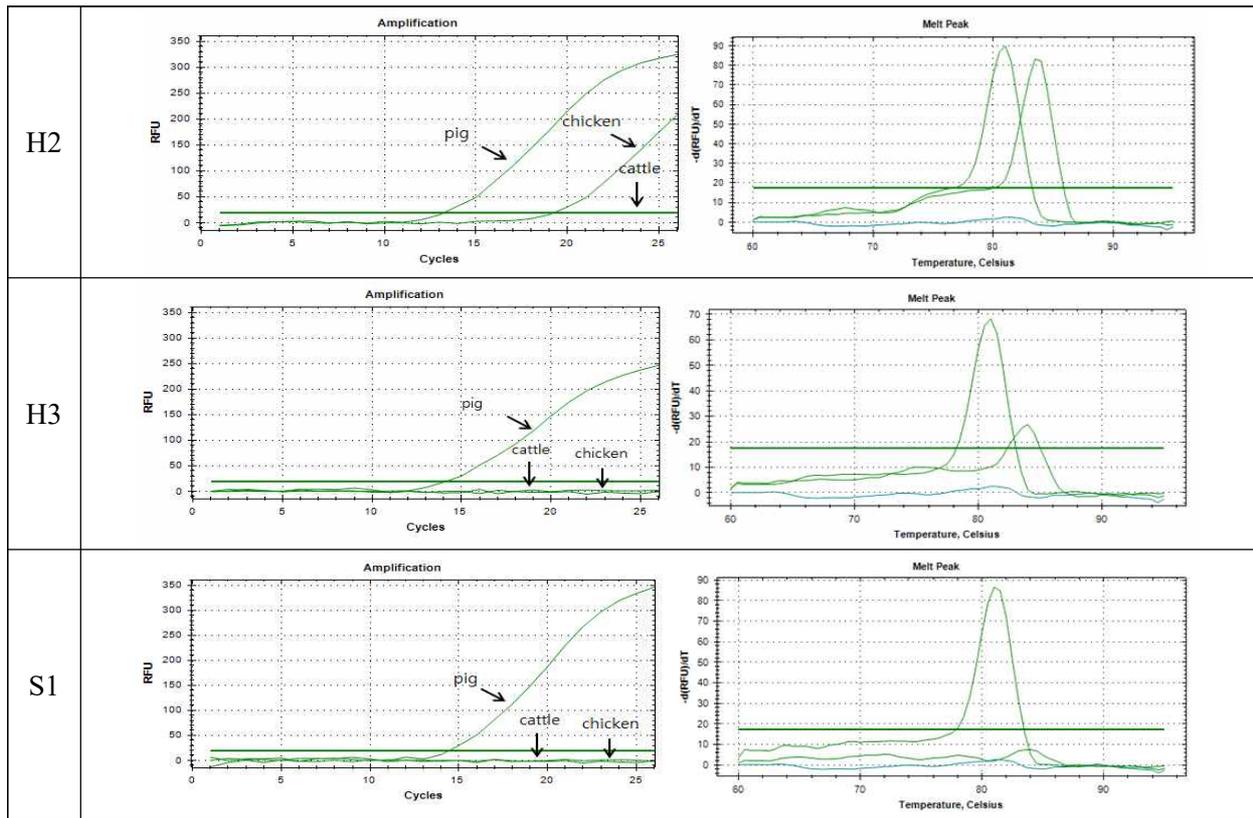
▶ **Real-time PCR을 이용한 혼합 육제품의 정량 분석**

- 혼합 육제품의 Real-time PCR 분석에서 증폭조건은 95°C에서 3분간 처리한 후 94°C에서 10초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 1 cycle로 하여 원료육에 비해 5 cycle 증가시킨 25cycle 반복하였음. 이는 육제품은 가공되어 원료육보다 검출 한계가 더 낮고 적은 양의 DNA까지 검출하기 위함. 혼합 육제품의 Real-time PCR을 위한 mixture의 조성은 원료육의 qPCR과 동일하게 적용. Melt curve 분석은 60°C에서 95°C까지 0.5 °C씩 0.05°C마다 온도를 올라가게 설정하여 각 primer마다 특이적인 온도를 나타내게 하였다.

표 5. 혼합 육제품에 대한 Real-time PCR 결과

구분	제품명	원료조성			Cycle quantification			25 cycle RFU		
		Cattle	Pig	Chicken	Cattle	Pig	Chicken	Cattle	Pig	Chicken
H2	엔네이쳐무안 양파		91.35		*N/A	13.5	19.6	-5	317	175
H3	더건강한햄 의성마늘		89.28		N/A	14.6	N/A	-1.04	238	0.9
S1	그릴비엔나		93.1		N/A	14.7	N/A	-1.07	334	0.3
S2	델립비엔나		85.79		N/A	14.6	18	0	309	242
S3	비엔나소시지		50.72	30.6	N/A	16.6	17.4	2.2	320	390.2
S6	롯데비엔나		84.95		N/A	15.4	19.6	-7	253	164
P1	양념한우너비 아니	-\$	-		18.1	16.1	N/A	302.3	401.3	12.1
P2	스테이크	-	-		22.1	14.9	N/A	99	337.7	-3.3
T1	신임격정남작 떡갈비	33.4	50.35		N/A	18.2	16.2	4.9	290.5	425.4
T4	이마트 떡갈비		76.24		35.4	18.5	18.8	-1	245	237

* No Amplification; \$ 함량 미표기



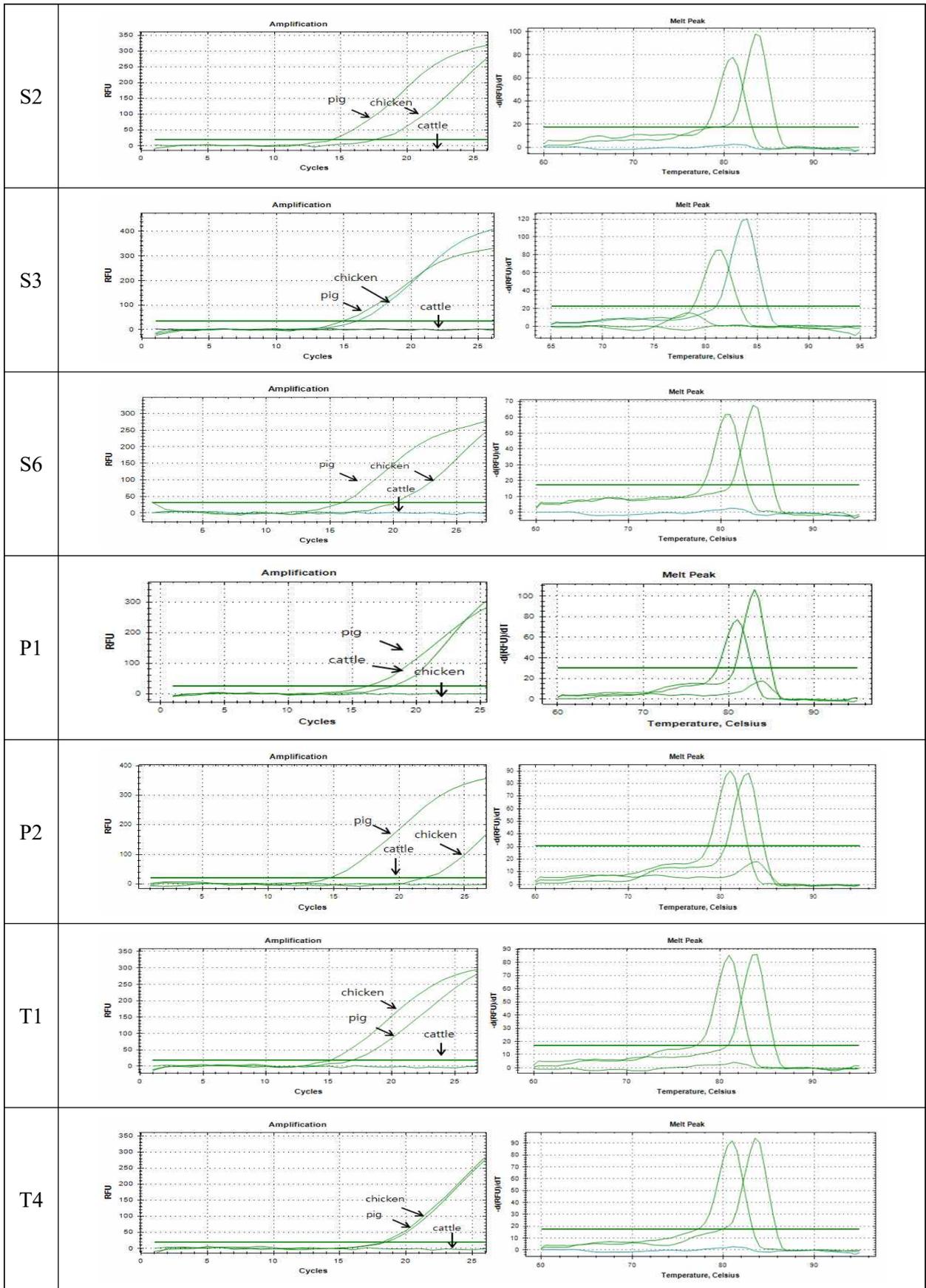


그림 19. 혼합 육제품에 대한 증폭곡선과 melt peak.

- 시판중인 52개 혼합 육제품에 대한 Real-time 분석을 실시.
- 표 5과 그림 19는 52개 혼합 육제품의 전체 결과 중 오표기의 가능성이 있는 5개 제품 (H2, S2, S6, T1, T4)과 성분표에 맞게 검출된 5개 제품 (H3, S1, S3, P1, P2)의 결과를 나타낸 것.
- 표 5에서 굵게 표시한 부분은 오표기의 가능성이 있는 제품으로 RFU 값을 통해 이들은 닭에서 PCR 반응이 일어났음을 알 수 있음.
- 그림 19의 증폭곡선과 melt peak 그래프를 통해서도 오표기 가능성이 있는 제품에서 닭이 검출된 것을 확인할 수 있었고, **이들 결과는 multiplex PCR을 통한 정성분석에서 확인된 결과와 일치하고 있음.**
- T1번은 소고기가 33.4 %로 표기돼있었으나 25 cycle로 분석하였을 때 증폭되지 않고 닭과 돼지만 25 cycle내에 증폭이 되었음.
- 이는 그만큼 소의 초기 DNA양이 적다는 것을 의미하며 표기된 함량 역시 증폭량과 다르다는 것을 확인할 수 있었고 이처럼 표기된 함량과 실제 증폭된 DNA양을 비교하여 정량한다면 표기와 다르게 포함된 원료의 함량을 확인할 수 있을 것이라 사료됨.
- 결과적으로 4개 축종의 특이적 primer set를 구축하였고, 정성분석을 위해 이들을 한 번에 증폭 할 수 있는 multiplex PCR의 condition 또한 확립하였음. 정량분석을 위한 원료육의 standard curve를 작성하기 위해 여러 번에 걸친 반복실험을 실시하였고, 돼지와 닭에 대한 standard curve를 확인할 수 있었음.
- **5개의 혼합 육제품에서는 제품 성분표상 오표기 가능성을 확인 함. 앞으로 식별 키트의 시제품 제작과 국내 공인 획득 및 실제 감식 현장과 분석 기관을 대상으로 현장 적용시험 실시할 계획에 있음.**

▶ Real-time PCR을 이용한 절대정량법 분석

○ 절대정량을 위해 각 축종의 standard curve를 제작

- 소, 돼지, 닭 DNA를 100, 50, 35, 25, 12.5, 5, 0.5, 0.05 ng/ μ l로 희석하였고 각 농도별 10회 반복을 수행.
- 본 연구는 원료육의 genomic DNA를 이용하여 각 200, 100, 75, 50, 25, 10, 1, 0.1 ng/ μ l까지 총 8개 농도로 기준을 정하였다. 먼저 각 축종 별로 10반복한 실험의 Cq값의 평균, 표준편차와 농도별 slope를 고려하여 하나씩 추출한 검량선의 Cq값을 표 6에 나타내었음.
- 또한 각 축종별 standard curve는 그림 20에, 기울기, PCR효율, 상관계수는 표 7에 나타내었음.
- Genomic DNA의 경우 염색체의 형태를 띄고 있어 정제 또는 합성된 DNA보다 PCR 효율 허용치가 80 ~ 120%로 넓어, 이 중 10반복한 결과에 돼지의 경우는 R²값은 다른 primer와 비슷하게 잡혔지만 효율이 낮은 것은 농도 단계별로 Cq값이 높아지지 않고 50, 25 ng/ μ l에서 비슷하게 나왔기 때문인 것으로 보임.
- 또한 선택된 곡선에서 세 축종의 R²값은 한번만 반복한 것으로 조금 떨어진 것으로 보이며 3개 primer의 PCR효율은 비슷하게 도출.

표 6. 타겟 프라이머 별 10반복의 Cycle quantification 평균 값

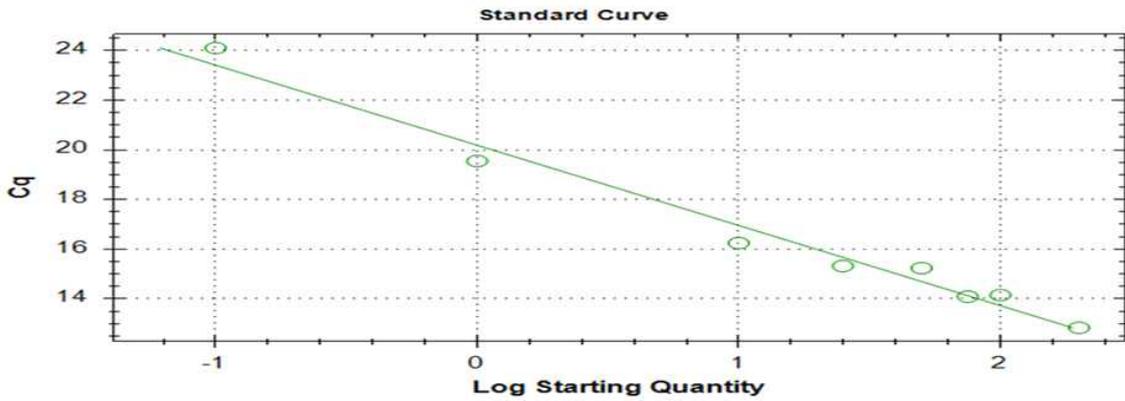
DNA concentration (ng/ μ l)			Cycle quantification mean							
			200	100	75	50	25	10	1	0.1
Target	A	Cattle	14.36 ±4.37	15.66 ±0.76	16.18 ±0.14	16.5 ±0.38	16.71 ±0.3	18.07 ±0.43	20.92 ±0.23	25.75 ±0.96
		Pig	12.98 ±0.29	14.64 ±0.22	16.27 ±0.33	15.46±0.35	15.33 ±0.26	19.26 ±0.31	24.08 ±0.25	27.80 ±0.35
		Chicken	14.53 ±1.60	17.64 ±0.30	17.85 ±0.22	18.81 ±0.37	20.84 ±0.71	21.81 ±1.51	23.48 ±0.72	28.72 ±0.86
	B	Cattle	12.84	14.15	14.09	15.24	15.32	16.25	19.55	24.10
		Pig	13.23	15.89	16.18	16.52	16.43	17.24	24.79	27.10
		Chicken	15.45	17.59	18.11	18.65	20.84	21.77	24.53	26.57

- A, 10 반복 표준곡선; B, 선택된 표준곡선.

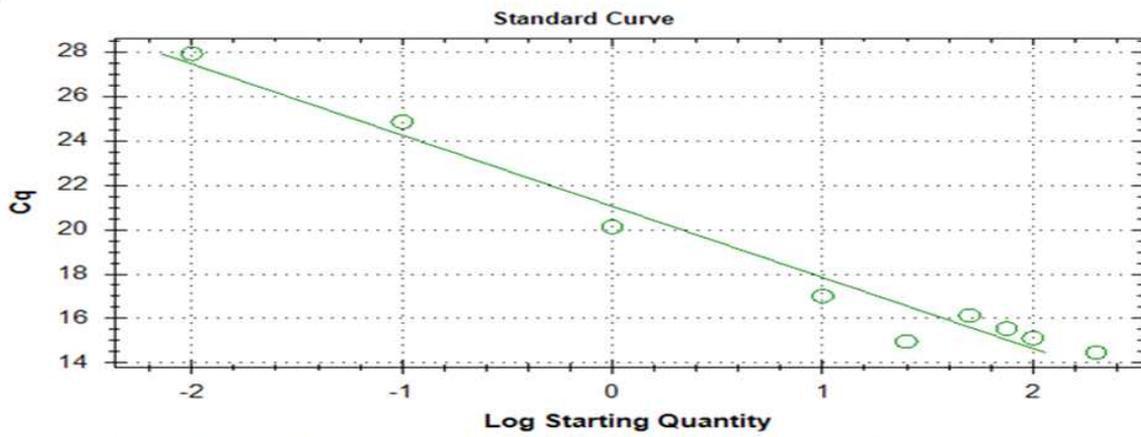
표 7. Real-Time PCR분석의 기울기와 효율과 R² 값

Species		Slope	Efficiency (E)	R ²
A	Cattle	-3.007	115%	0.980
	Pig	-4.445	67.9%	0.985
	Chicken	-3.466	94.3%	0.981
B	Cattle	-3.231	104%	0.979
	Pig	-3.208	105%	0.968
	Chicken	-3.238	108%	0.935
C	Cattle	-3.378	97.7%	0.991
	Pig	-3.703	86.2%	0.952
	Chicken	-3.055	112.5%	0.984

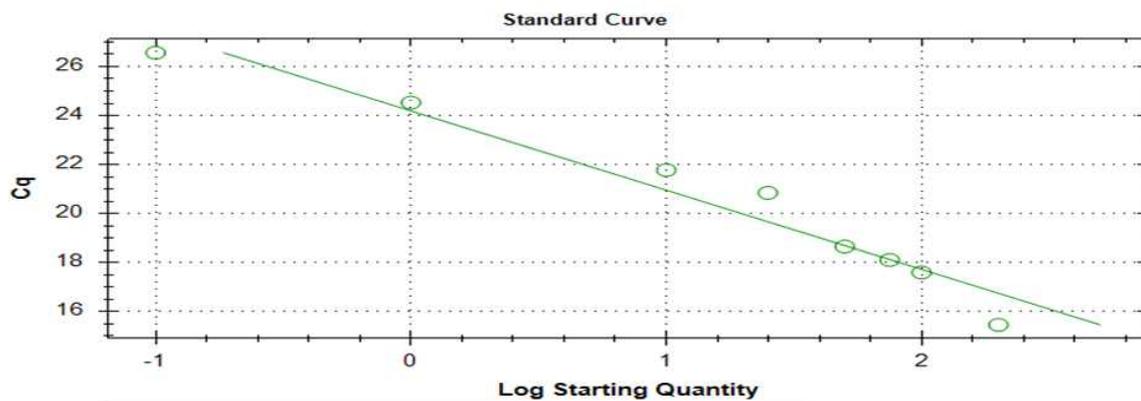
- A, 10 반복 표준 곡선(타겟 프라이머); B, 선택된 표준 곡선(타겟 프라이머), C, 18S rRNA 프라이머.



(a)
 Standard
 Unknown
 SYBR E=104.0% R²=0.979 Slope=-3.231 y-int=20.187



(b)
 Standard
 Unknown
 SYBR E=105.0% R²=0.968 Slope=-3.208 y-int=21.054



(c)
 Standard
 Unknown
 SYBR E=103.6% R²=0.953 Slope=-3.238 y-int=24.190

그림 20. 각 primer와 희석된 DNA(200-0.1 ng/μl)의 real-time PCR 표준 곡선 (a), cattle (b), pig (c), chicken.

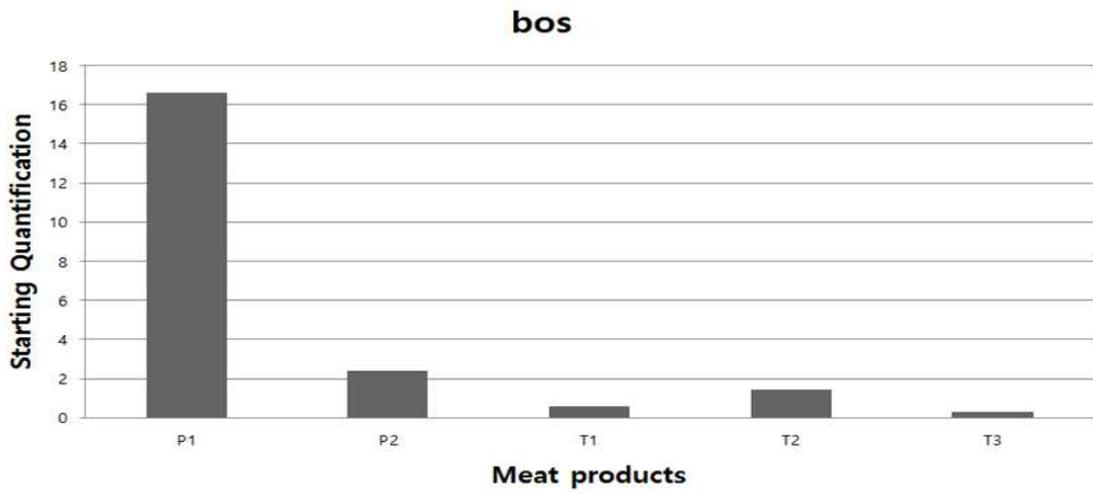


그림 21. 소 primer를 적용한 육제품의 Starting quantity 값.

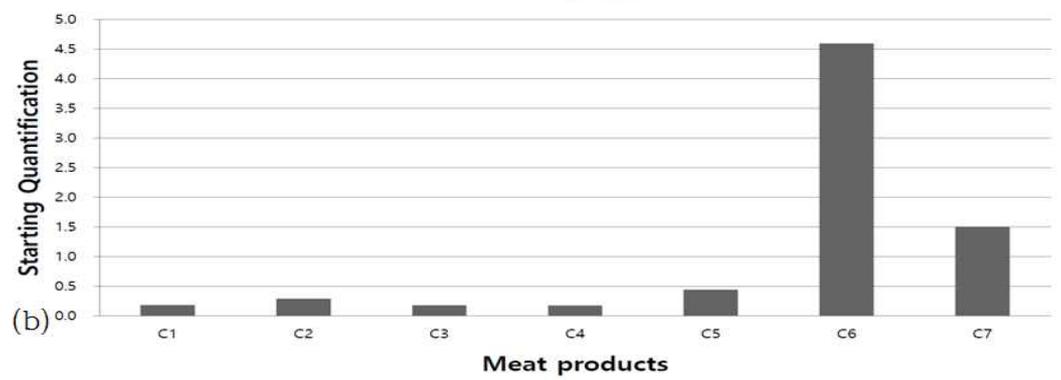
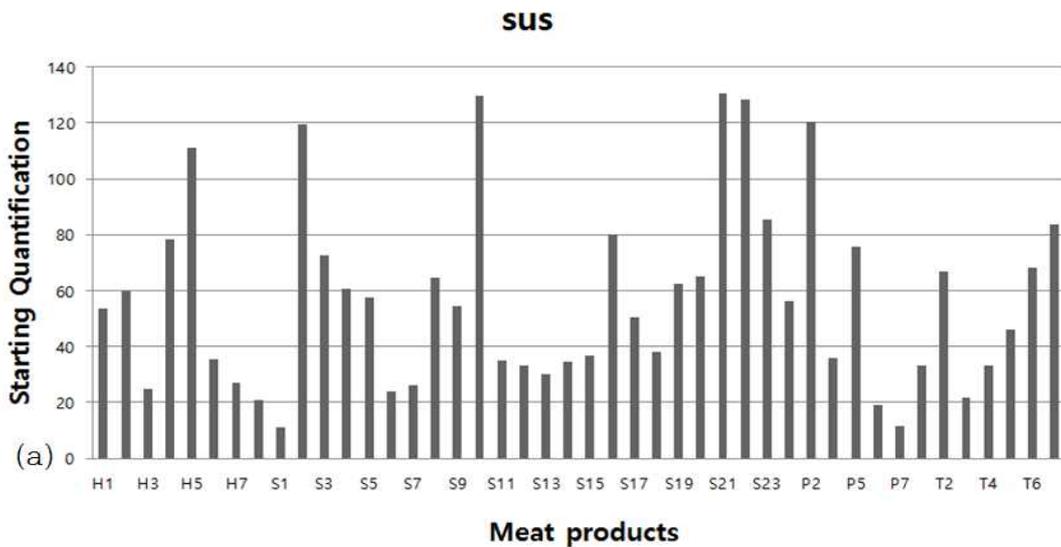


그림 22. 돼지 primer를 적용한 육제품의 Starting quantity 값. (a) except canned ham; (b) canned ham.

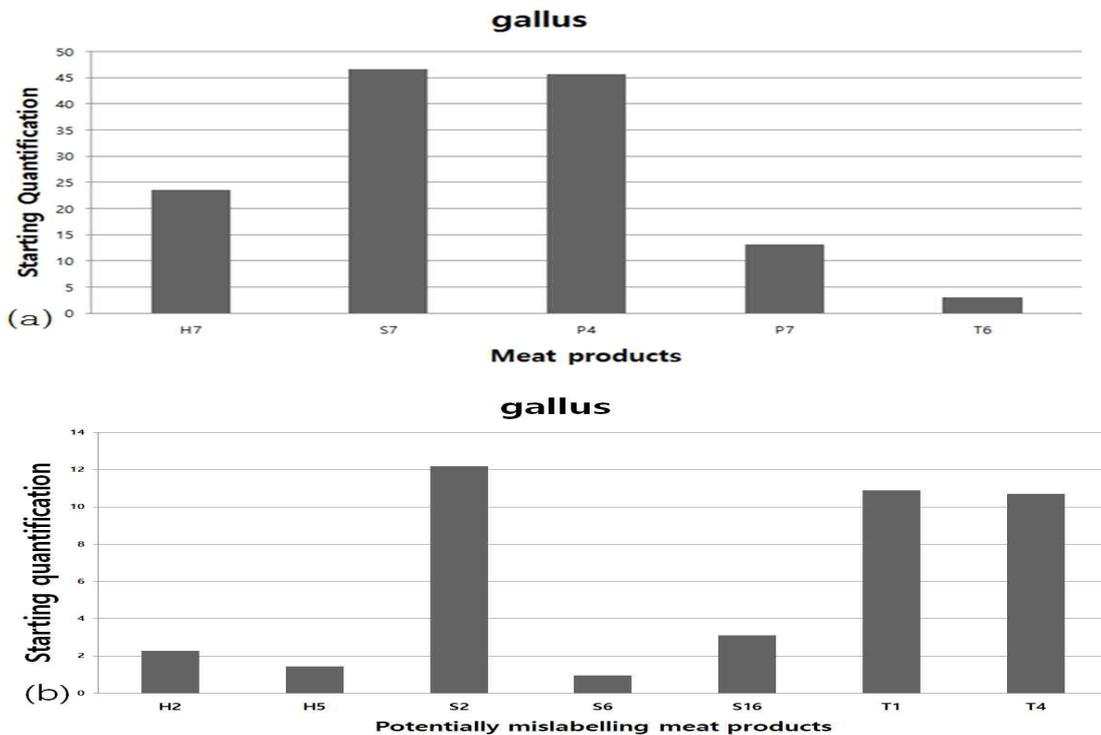


그림 23. 닭 primer를 적용한 육제품의 Starting quantity 값. (a) labeling chicken ingredient in meat products; (b) potentially mislabelling meat products.

○ 상대정량을 이용한 분석 시스템

- 상대정량은 특이적인 PCR 산물을 확인한 뒤에 원료육과 가공육에 각각 housekeeping primer와 targer primer가 적용된 Ct값을 비교하는 $\Delta\Delta C(t)$ 방법(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용해 각 sample을 정량.

- 또한 house keeping gene의 PCR효율을 조사하기 위한 standard curve를 제작하기 위해 소, 돼지, 닭 DNA를 10, 5, 0.5, 0.05 ng/ μ l로 희석하여 PCR을 수행.

- 각 축종의 18S rRNA 염기서열에서 보존된 염기서열을 찾아 primer를 설계하였음.

- $\Delta\Delta C(t)$ 방법은 housekeeping primer와 target primer의 PCR 효율이 비슷하다는 조건하에서 성립되는 방법이므로 세 축종의 PCR효율을 조사하였는데 각 DNA를 10, 5, 0.5, 0.05 ng/ μ l로 희석하여 18S rRNA primer로 표준곡선을 그린 결과 소 97.7% R²값 0.99, 돼지 86.2% R²값 0.95, 닭 112.5% R²값 0.98으로 나타나 target primer의 표준곡선 PCR 효율과 비슷하게 나타났음.

- 소, 돼지의 검출한계는 0.1 ng/ μ l였고 닭의 검출한계는 1 ng/ μ l로 나타났다(표 8, 그림 24). Melting curve 분석은 melting temperature(TM)를 계산해 원하지 않는 증폭이 이루어졌는지 확인하기 위해 실시해 livark *et al.*(1995)의 $\Delta\Delta C(t)$ 방법을 이용하였고 보정된 값은 primer별로 그림 25~27에 나타내었음.

○ 상대정량 분석 시스템을 위한 통계분석

- 모든 실험은 3반복으로 실시되었으며 통계분석은 각 primer별로 원료육과 sample사이의 3반복 Cq값의 유의적 차이를 검증하기 위해 실시되었다. Microsoft excel program의 Student's t-test를 이용하여 p-value를 도출하였으며 유의수준은 $p \leq 0.05$ 로 설정.

- 검증방법은 원료육과 제품의 같은 primer끼리의 3반복한 Cq값을 t-test검증하였다. 유의성이 없는 것($p>0.05$)은 원료육과 가공제품의 차이가 없는 것으로 판단하였고 유의성이 있다고 판단되는 것은($p<0.05$) 같은 primer를 이용하여도 가공 처리된 제품에서의 Cq값이 더 높아 PCR검출 반응에 영향을 끼친 것으로 판단하였다. P-value를 포함한 전체적인 육가공품 분석표는 표 9~13에 나타내었음.

표 8. 18S rRNA gene primer의 Cycle quantification 값

		Cycle quantification			
DNA concentration (ng/ μ l)		20	10	1	0.1
18S rRNA	Cattle	15.90	17.47	20.10	24.01
	Pig	17.86	21.44	23.60	27.61
	Chicken	24.63	25.60	27.88	N/A

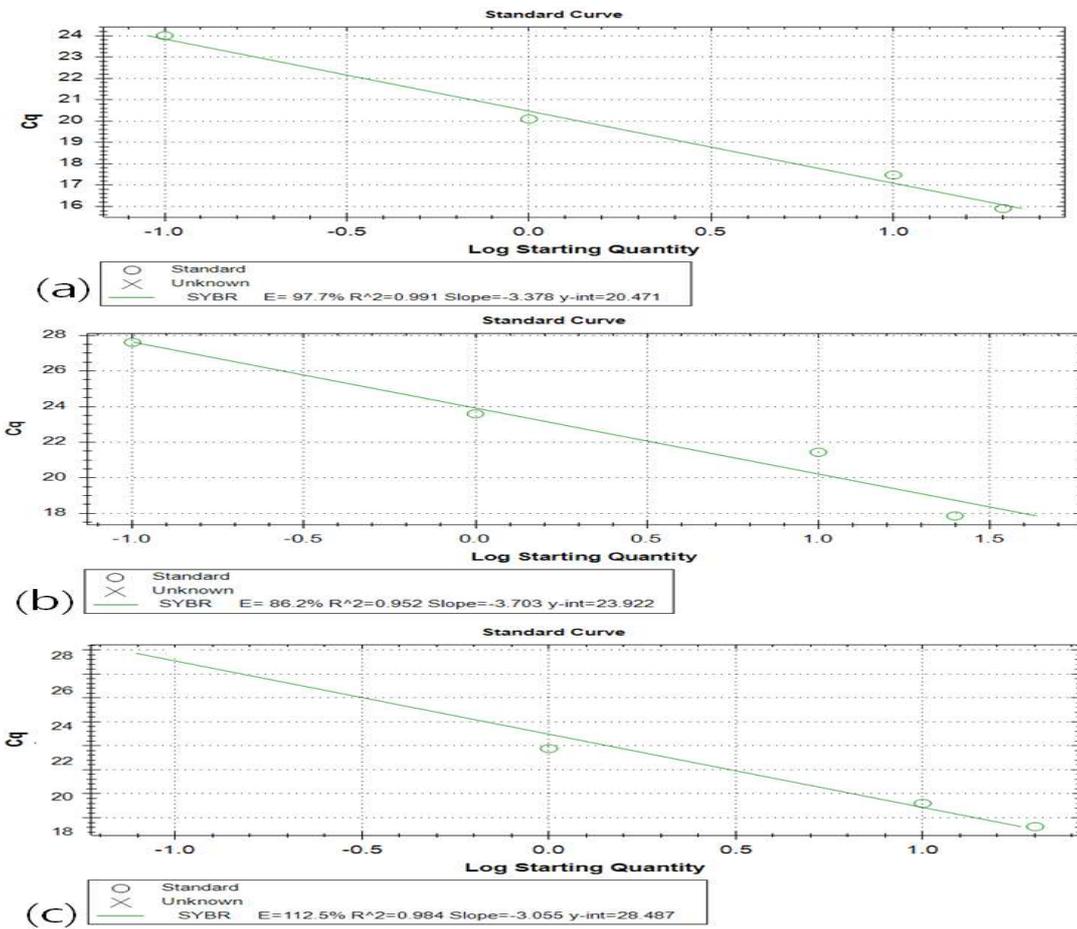


그림 24. Standard curve of diluted DNA (20-0.1 ng/ μ l) by real-time PCR with 18S rRNA primer SYBR Green I dye. (a), cattle (b), pig (c), chicken.

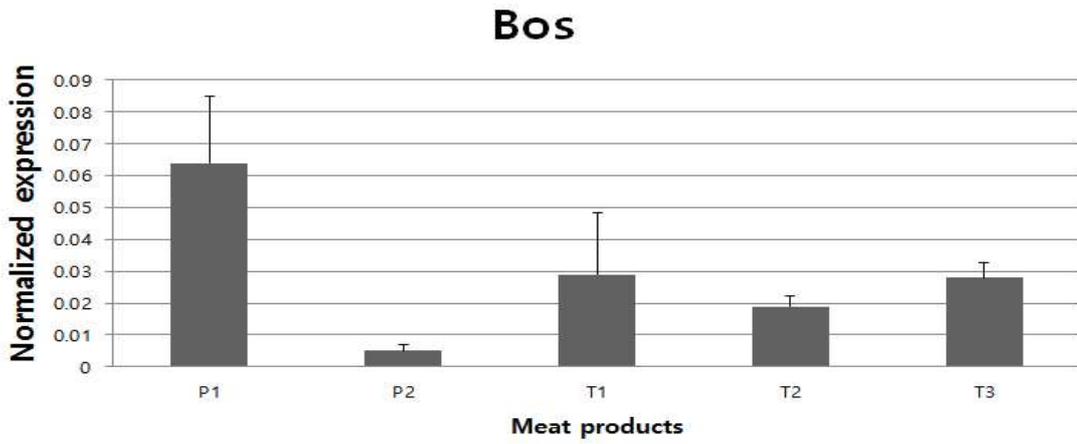
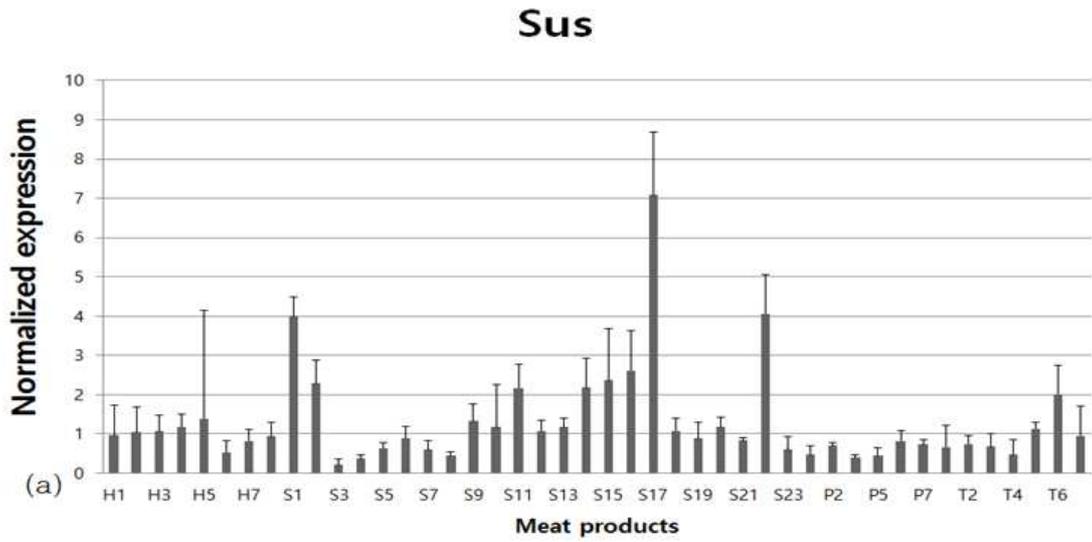
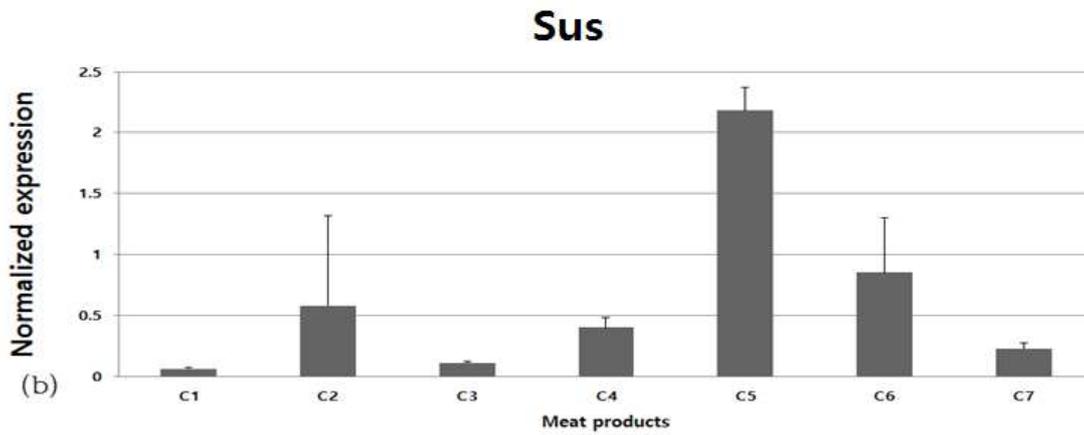


그림 25. 소 primer의 보정된 발현 값.



(a)



(b)

그림 26. 돼지 primer의 보정된 발현 값. (a) except canned ham; (b) canned ham.

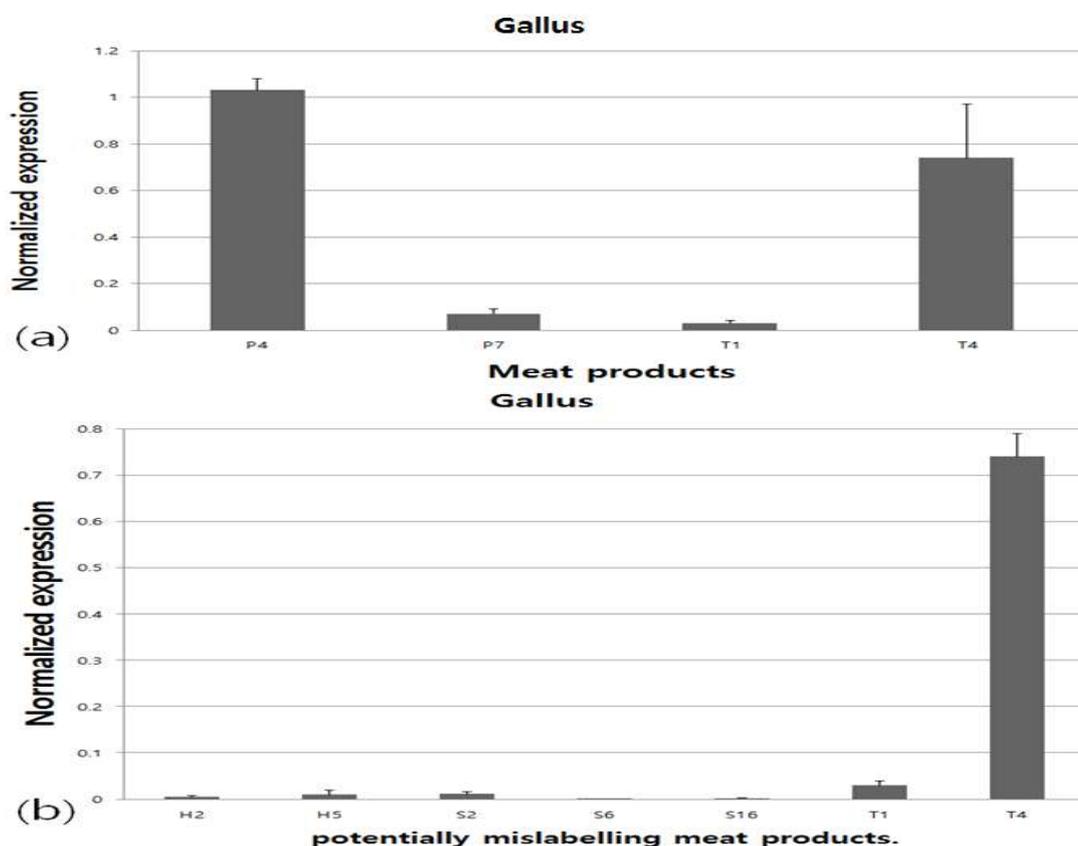


그림 27. 닭 primer의 보정된 발현 값. (a) labeling chicken ingredient in meat products; (b) potentially mislabelling meat products.

표 9. Press ham의 종합적인 분석결과

Sample			Content (%)	18S rRNA Cq Mean	^f Cq		^g SQ Mean	$\Delta\Delta C(t)$		P-value
					Mean	Stdev.		Mean	Stdev.	
H1	^a T	^c B ^d S ^e G	91.73	16.31	17.48	1.09	53.7	0.97	0.78	0.512
	^b H	B S G								0.124
H2	T	B S G	91.35	15.87	16.29	0.31	60	1.04	0.64	0.035*
	H	B S G			23.32	0.97	2.26	0.005	0.003	0.026*
H3	T	B S G	89.28	16.99	17.26	0.55	35.23	1.07	0.4	0.549
	H	B S G								0.578

표 9. 계속

Sample			Contents(%)	18S rRNA Cq Mean	^f Cq		^g SQ Mean	$\Delta\Delta C(t)$		P-value
					Mean	Stdev.		Mean	Stdev.	
H4	T	B S G	90	15.37	15.44	0.08	78.4	1.19	0.31	0.000*
	H	B S G								
H5	T	B S G	91.74	15.21	16.16	0.57	111	2.53	2.75	0.649
	H	B S G								
H6	T	B S G	90.02	15.96	17.27	0.7	35.6	0.54	0.28	0.649
	H	B S G								
H7	T	B S G	53.59 25.82	16.61	17.25	0.28	26.9	0.82	0.3	0.316
	H	B S G								
H8	T	B S G	91.59	16.97	17.44	0.61	21	0.94	0.37	0.925
	H	B S G								

^aT: Target primer; ^bH: Housekeeping gene primer; ^cB: *Bos taurus*; ^dS: *Sus scrofa*; ^eG: *Gallus gallus*; ^fCq: Cycle quantification; ^gSQ: Starting quantity; *: p<0.05 by t-tests.

표 10. Sausage의 종합적인 분석결과

Sample			Conte nts(%)	18S rRNA Cq Mean	^f Cq		^g SQ	$\Delta\Delta C(t)$		P -value
					Mean	Stdev.	Mean	Mean	Stdev.	
S1	^a T	^c B ^d S ^e G	93.1	17.32	14.88	0.21	11.12	4	0.5	0.512
	^b H	B S G								0.124
S2	T	B S G	85.79	16.15	14.54 21.31	0.58 0.48	119.6 12.2	2.29 0.011	0.58 0.005	0.035* 0.026*
	H	B S G								0.207 0.009*
S3	T	B S G	50.72 30.56	15.74	17.84 19.5	0.14 0.31	72.53 46.72	1.07 0.002	0.14 0.001	0.549 0.546
	H	B S G								0.578 0.005*
S4	T	B S G	93.07	15.04	16.1	0.11	60.55	0.37	0.11	0.000*
	H	B S G								0.007*
S5	T	B S G	O	15.45	15.66	0.13	57.38	0.64	0.13	0.649
	H	B S G								0.542
S6	T	B S G	84.95	16.33	16.1 23.3	0.28 1.23	24.04 2.88	0.9 0.001	0.3 0.0004	0.649 0.004*
	H	B S G								0.018* 0.009*
S7	T	B S G	90	16.01	16.33	0.34	26.06	0.61	0.21	0.649
	H	B S G								0.542
S8	T	B S G	O	15.63	16.37	0.34	64.47	0.45	0.1	0.649
	H	B S G								0.018*

^aT: Target primer; ^bH: Housekeeping gene primer; ^cB: *Bos taurus*; ^dS: *Sus scrofa*; ^eG: *Gallus gallus*; ^fCq: Cycle quantification; ^gSQ: Starting quantity; *: p<0.05 by t-tests.

표 10. 계속

Sample	Conten ts(%)	18S rRNA Cq Mean	^f Cq		^g SQ Mean	$\Delta\Delta C(t)$		P -value		
			Mean	Stdev.		Mean	Stdev.			
S9	^a T	^c B ^d S ^e G	91.73	16.94	17.18	0.26	54.66	1.33	0.44	0.512
	^b H	B S G								0.124
S10	T	B S G	91.13	13.9	14.68	0.15	129.5	1.17	1.1	0.035*
	H	B S G								0.207
S11	T	B S G	94.66	15.91	15.42	0.22	35.23	2.17	0.6	0.549
	H	B S G								0.578
S12	T	B S G	86.08	16.13	16.63	0.24	33.36	1.09	0.26	0.000*
	H	B S G								0.007*
S13	T	B S G	90.03	16	16.37	0.21	30.36	1.18	0.22	0.649
	H	B S G								0.542
S14	T	B S G	86.35	16.71	16.24	0.05	34.63	2.19	0.74	0.649
	H	B S G								0.018*
S15	T	B S G	O	16.09	15.63	0.42	36.95	2.37	1.32	0.649
	H	B S G								0.542
S16	T	B S G	90	17.53 25.94	16.8 0.91	0.52 0.723	80.02 0.001	2.62 0.001	1	0.649 0.018*
	H	B S G								0.084 0.051

^aT: Target primer; ^bH: Housekeeping gene primer; ^cB: *Bos taurus*; ^dS: *Sus scrofa*; ^eG: *Gallus gallus*; ^fCq: Cycle quantification; ^gSQ: Starting quantity; *: p<0.05 by t-tests.

표 10. 계속

Sample			Concen ts(%)	18S rRNA Cq Mean	^f Cq Mean Stdev.		^g SQ Mean	$\Delta\Delta C(t)$ Mean Stdev.		P -value
S17	^a T	^c B ^d S ^e G	91.52	17.98	15.41	0.14	50.7	7.09	2.32	0.512
	^b H	B S G								0.124
S18	T	B S G	90.64	16.54	16.63	0.07	38.2	1.09	0.3	0.035*
	H	B S G								0.207
S19	T	B S G	92.09	16.45	16.91	0.52	62.4	0.89	0.41	0.549
	H	B S G								0.578
S20	T	B S G	90.68	16.89	16.87	0.14	64.89	1.17	0.25	0.000*
	H	B S G								0.007*
S21	T	B S G	90.13	16.25	16.69	0.31	130.6	0.84	0.07	0.649
	H	B S G								0.542
S22	T	B S G	94.67	17.14	16.05	0.11	128.2	4.07	4.86	0.649
	H	B S G								0.018*
S23	T	B S G	93.36	15.81	16.95	0.4	85.44	0.6	0.341	0.649
	H	B S G								0.542

^aT: Target primer; ^bH: Housekeeping gene primer; ^cB: *Bos taurus*; ^dS: *Sus scrofa*; ^eG: *Gallus gallus*; ^fCq: Cycle quantification; ^gSQ: Starting quantity; *: p<0.05 by t-tests.

표 11. Patties의 종합적인 분석결과

Sample	Conten ts(%)	18S rRNA Cq Mean	^f Cq		^g SQ Mean	$\Delta\Delta C(t)$		P -value
			Mean	Stdev.		Mean	Stdev.	
P1	^a T	^c B O	16.35	0.35	15.6	0.064	0.021	0.020*
		^d S O	16.35	17.7	56.4	0.48	0.23	0.113
	^e G							0.171 0.171
P2	T	B S G	15.71	16.39	120.5	0.005	0.003	0.013* 0.184
	H	B S G						0.234 0.106
P3	T	B S G	17.39	18.9	35.95	0.4	0.07	0.013*
	H	B S G						0.040*
P4	T	B S G	21.23	19.06	45.66	1.03	0.05	0.040*
	H	B S G						0.023*
P5	T	B S G	16.71	17.16	75.72	0.45	0.2	0.337
	H	B S G						0.017*
P6	T	B S G	18.56	19.06	18.94	0.83	0.27	0.008*
	H	B S G						0.022*
P7	T	B S G	45.6	18.79	11.7	0.73	0.12	0.002*
		G	29.2	21.9	13.16	0.07	0.02	0.004*
	H	B S G						0.002* 0.004*

^aT: Target primer; ^bH: Housekeeping gene primer; ^cB: *Bos taurus*; ^dS: *Sus scrofa*; ^eG: *Gallus gallus*; ^fCq: Cycle quantification; ^gSQ: Starting quantity; *: p<0.05 by t-tests.

표 12. Tteokgalbi의 종합적인 분석결과

Sample			Conten ts(%)	18S rRNA Cq Mean	^f Cq		^g SQ Mean	$\Delta\Delta C(t)$		P -value
					Mean	Stdev.		Mean	Stdev.	
T1	^a T	^c B	33.43		21.56	0.37	0.406	0.029	0.0195	0.005*
		^d S	50.35	17.71	19.16	0.54	33.47	0.67	0.56	0.024*
		^e G			21.85	0.25	10.88	0.03	0.01	0.092*
T2	T	B	9.93		20.36	0.02	1.011	0.019	0.0033	0.003*
		S	53.66	16.13	17.17	0.48	66.81	0.74	0.23	0.388
		G								
T3	H	B								0.076
		S								0.846
		G								
T4	T	B	10.28		22.04	0.57	0.27	0.028	0.0046	0.001*
		S	51.42	18.37	19.63	0.51	21.94	0.68	0.34	0.006*
		G								
T5	H	B								0.005*
		S								0.018*
		G								
T6	T	B	76.24	16.58	18.73	1.81	33.41	0.48	0.37	0.237
		S			21.79	0.12	10.69	0.02	0.002	0.002*
		G								
T7	H	B								0.089
		S								0.001*
		G								
T8	T	B	75.91	18.28	18.67	0.06	46.08	1.13	0.17	0.012*
		S								
		G								
T9	H	B								0.008*
		S								
		G								
T10	T	B	61.91	16.77	16	1.33	68.13	2.02	0.72	0.137
		S	4.12		23.62	0.36	3.1	0.008	0.002	0.009*
		G								
T11	H	B								0.661
		S								0.000*
		G								
T12	T	B	75.91	15.11	15.76	0.18	83.47	0.95	0.77	0.000*
		S								
		G								
T13	H	B								0.156
		S								
		G								

^aT: Target primer; ^bH: Housekeeping gene primer; ^cB: *Bos taurus*; ^dS: *Sus scrofa*; ^eG: *Gallus gallus*; ^fCq: Cycle quantification; ^gSQ: Starting quantity; *: p<0.05 by t-tests.

표 13. Canned ham의 종합적인 분석결과

Sample			Content ts(%)	18S rRNA Cq Mean	^f Cq Mean Stdev.		^g SQ Mean	$\Delta\Delta C(t)$ Mean Stdev.		P -value
C1	^a T	^c B ^d S ^e G	95.08	21.74	26.04	0.53	0.18	0.06	0.01	0.001*
	^b H	B S G								0.005*
C2	T	B S G	91.11	23.59	25.55	0.18	0.28	0.58	0.74	0.014*
	H	B S G								0.001*
C3	T	B S G	95.76	21.13	24.59	0.35	0.17	0.11	0.01	0.001*
	H	B S G								0.002*
C4	T	B S G	95.7	24.49	26.12	0.2	0.17	0.4	0.08	0.001*
	H	B S G								0.004*
C5	T	B S G	87.48	21.04	20.2	0.07	0.44	2.18	0.19	0.008*
	H	B S G								0.006*
C6	T	B S G	95.2	19.83	20.48	0.33	4.59	0.85	0.45	0.002*
	H	B S G								0.010*
C7	T	B S G	28.8 58	25.95	0.12	1.5	0.23	0.04	23.5	0.001*
	H	B S G								0.003*

^aT: Target primer; ^bH: Housekeeping gene primer; ^cB: *Bos taurus*; ^dS: *Sus scrofa*; ^eG: *Gallus gallus*; ^fCq: Cycle quantification; ^gSQ: Starting quantity; *: p<0.05 by t-tests.

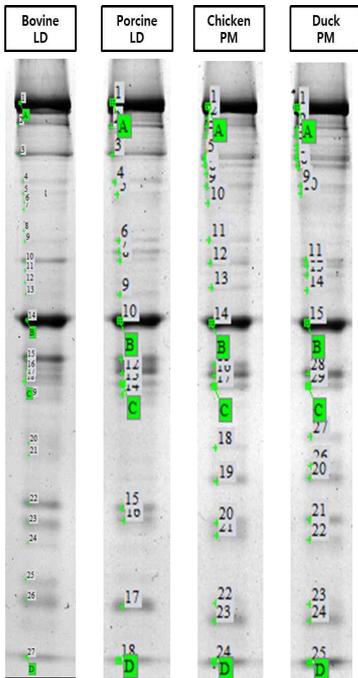
■ 제1협동 과제 연구 내용

▶ 1차원 전기영동법을 통한 축종별 사이적 발현 단백질 구명

○ 근원섬유단백질 비교

- 주요 4축종(소, 돼지, 닭, 오리)의 주요 근육을 채취하여 근원섬유단백질을 추출한 후 1차원 전기영동법으로 단백질을 분리함(그림 1-A).
- 총 27개의 단백질 bands를 분리하였고, 우육 등심을 기준으로 돈육은 22종, 계육은 17종 및 오리육은 21종의 단백질 bands를 확인하였고 matched protein 정보 및 각 bands의 vol%를 분석하여 축종 간 비교하였음(그림 1-B, 1-C).

(A) 1D gel image



(B) Matched protein ID

Bovine	Porcine	Chicken	Duck
1	1	1	1
2	2	3	2
3	3	5	6
4	4	9	9
5	-	-	10
6	5	-	-
9	6	-	-
10	8	12	11
11	-	-	12
12	-	13	13
13	9	-	14
14	10	14	15
15	11	15	-
16	12	16	28
18	13	-	-
19	14	-	-
20	-	18	-
21	-	-	26
22	15	-	21
23	16	-	22
26	17	22	23
27	18	24	25

(C) Vol% of each protein

Match ID	Duck	Chicken	Porcine	Bovine
1	2.52	2.37	4.96	2.25
2	0.81	0.58	0.88	1.31
3	0.64	0.60	0.55	0.64
4	0.28	0.27	0.22	0.21
5	0.24	-	-	0.31
6	-	-	0.22	0.15
9	-	-	0.22	0.14
10	0.36	0.20	0.36	0.46
11	0.33	-	-	0.32
12	0.20	0.21	-	0.16
13	0.11	-	0.14	0.13
14	5.35	2.75	2.91	2.03
15	-	0.37	0.34	0.38
16	0.24	0.25	0.52	0.42
18	-	-	0.14	0.22
19	-	-	0.14	0.23
20	-	0.12	-	0.15
21	0.12	-	-	0.10
22	0.30	-	0.25	0.18
23	0.20	-	0.12	0.15
26	0.25	0.14	0.14	0.15
27	0.34	0.42	0.31	0.32

그림 1. 축종에 따른 근원섬유단백질의 1차원 전기영동 및 이미지분석을 통한 비교.

- 질량분석을 통해 확인된 주요 단백질은 myosin, myosin-binding protein C, actin, tropomyosin, myosin light chain 등이었음(표 1).
- Myosin 및 actin 단백질은 각각 돼지 등심근과 오리 흉근에서 다른 축종보다 약 2배가량 많이 발현되었고, Tropomyosin beta chain의 경우 다른 축종에서는 발현되었으나 오리 흉근에서는 발현되지 않았음. 또한 Myosin light chain 1의 경우 계육 흉근에서는 발현되지 않았음(그림 2).
- 따라서 근원섬유단백질 중 Tropomyosin beta chain 및 Myosin light chain 1을 축종을 구분하는 단백질로 선발함.

표 1. Maldi-Tof/Tof를 통한 근원섬유단백질 질량 분석

Spot label	Protein ID ^{a)}	Accession number ^{a)}	Species	Theoretical MW(Da) ^{b)}	Score ^{c)}	Matched peptide ^{d)}
1	Myosin-1	gi 41386691	Bos taurus	223764	557	53
	Myosin-1	gi 157279731	Sus scrofa	223947	570	57
	Myosin heavy chain	gi 61657939	Gallus gallus	224010	410	49
2	Myosin-binding protein C, slow-type isoform X1	gi 528949469	Bos taurus	138077	85	24
3	Mercuric reductase, partial	gi 511422615	Pseudomonas sp.	37977	63	7
10	hCG2045827	gi 119631043	Homo sapiens	3399	40	5
14	Actin	gi 59939793	Panax ginseng	10856	54	1
15	Tropomyosin beta chain	gi 431902817	Pteropus alecto	42171	133	20
22	Myosin light chain 1	gi 119601750	Bos taurus	21033	114	17
26	Myosin regulatory light chain 2	gi 115497166	Bos taurus	19114	289	21

^{a)}Protein names and accession numbers were taken from the NCBI database.

^{b)}Theoretical molecular weight and pI(recorded in NCBI database).

^{c)}The MASCOT baseline significant score is 70, and for the proteins identified in more than one spot, the highest score was presented.

^{d)}Number of matched peptides.

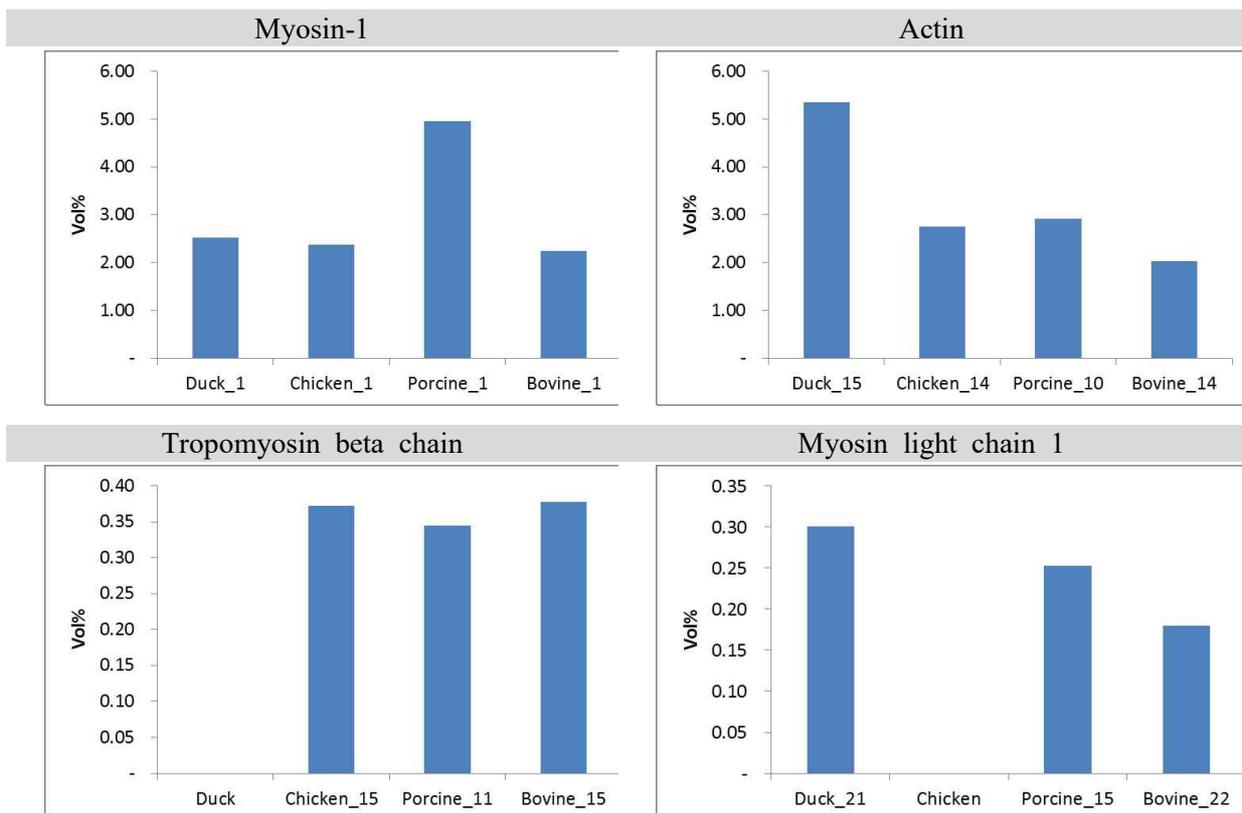


그림 2. 축종에 따른 대표적인 근원섬유단백질의 함량 비교.

○ 근장단백질 비교

- 근원섬유 단백질 분석과 동일한 시료 및 방법으로 분석을 실시하였으며, 근장단백질에서는 총 24개의 단백질 bands를 확인하였음(그림 3-A).
- 우육에서 확인된 단백질 bands를 기준으로 돈육은 16개의 bands, 계육은 15개, 오리육은 17개의 단백질 bands를 확인하였음. 이들 각각의 단백질 bands의 match 정보 및 각 band의 vol%값을 그림 3-B 및 그림 3-C에 나타내었음.

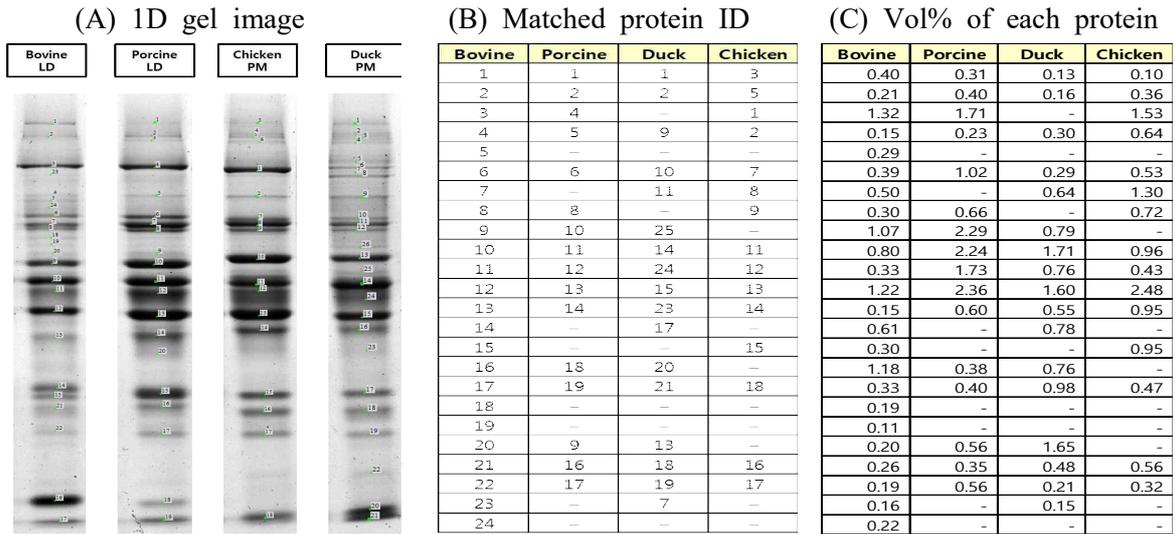


그림 3. 축종에 따른 근장단백질의 1차원 전기영동 및 이미지분석을 통한 비교.

- 근장단백질에서 확인된 주요 단백질은 Glycogen phosphorylase, Phosphoglucomutase-1, Glucose-6-phosphate isomerase, Creatine kinase M-type, Carbonic anhydrase 3, Phosphoglycerate mutase 2 및 Myoglobin 등이었음(표 2).

표 2. 주요 근장단백질의 Maldi-Tof/Tof 분석 결과

Spot label	Protein ID ^{a)}	Accession number ^{a)}	Species	Theoretical MW(Da) ^{b)}	Score ^{c)}	Matched peptide ^{d)}
3	Glycogen phosphorylase	gi 154426116	Bos taurus	97683	702	56
4	Heat shock cognate 71	gi 326933304	Meleagris gallopavo	71055	104	20
6	Phosphoglucomutase-1	gi 350538593	Sus scrofa	61971	421	34
7	Poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X11	gi 545841003	Sus scrofa	65446	567	38
8	Glucose-6-phosphate isomerase	gi 47523720	Sus scrofa	63257	244	25
12	Creatine kinase M-type	gi 194018722	Sus scrofa	43260	422	27
13	L-lactate dehydrogenase A chain	gi 288860136	Sus scrofa	36852	341	29
14	Carbonic anhydrase 3	gi 77735829	Bos taurus	29637	554	27
15	Phosphoglycerate mutase 2	gi 296475149	Bos taurus	28852	323	22
16	Myoglobin	gi 27806939	Bos taurus	17067	626	19

^{a)}Protein names and accession numbers were taken from the NCBI database.

^{b)}Theoretical molecular weight and pI(recorded in NCBI database).

^{c)}The MASCOT baseline significant score is 70, and for the proteins identified in more than one spot, the highest score was presented.

^{d)}Number of matched peptides.

- 확인된 단백질 중 Glycogen phosphorylase 및 Glucose-6-phosphate isomerase는 우육, 돈육 및 계육에서는 발현되었으나 오리육에서는 나타나지 않았으며, Carbonic anhydrase 3는 돈육과 계육에서 발현되지 않았고, Phosphoglycerate mutase 2는 돈육 및 오리육에서 발현되지 않았음(그림 4).

- 따라서 위의 4종의 근장단백질을 축종을 구분하는 특이적 발현 단백질로 선발하였음.

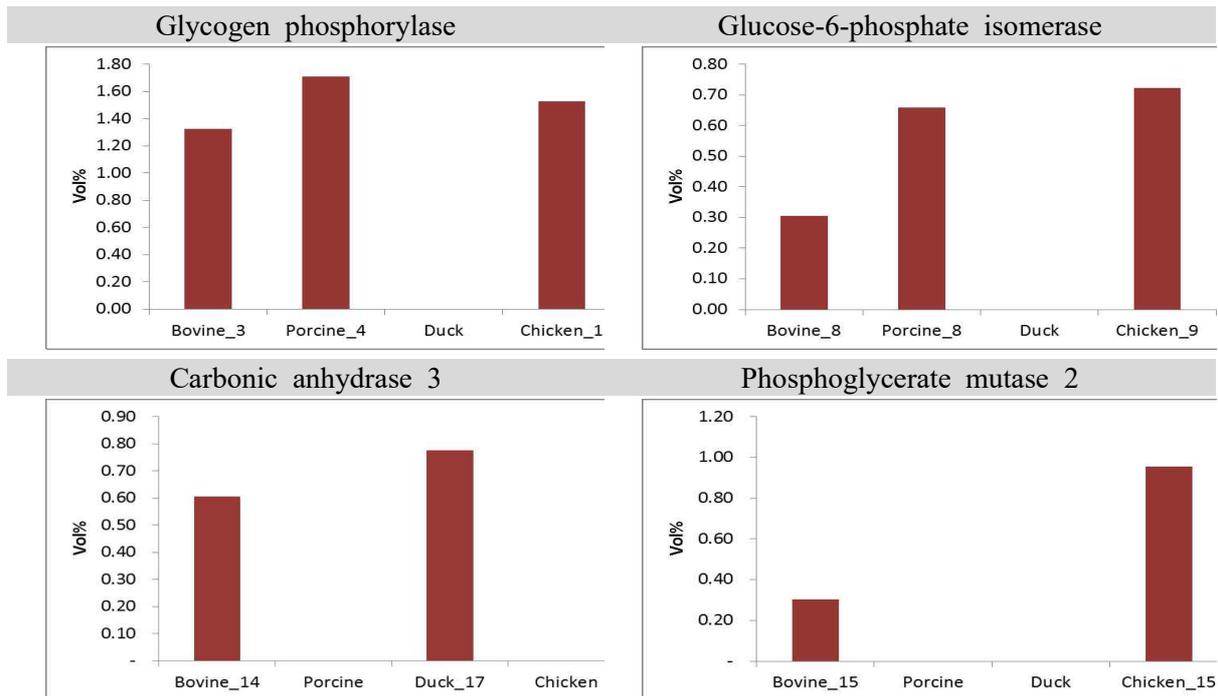


그림 4. 축종에 따른 대표적인 근장단백질의 함량 비교.

▶ 2종 이상의 이성체를 가지고 있는 단백질 비교를 통한 축종 구분

○ 돼지 등심근의 마이오신 아형(myosin heavy chain isoforms) 비교

- 돼지 등심근(*longissimus dorsi m.*)에서 추출한 단백질을 전기영동법으로 분리하여 마이오신 아형을 LC-MS/MS로 분석을 실시함(그림 4).

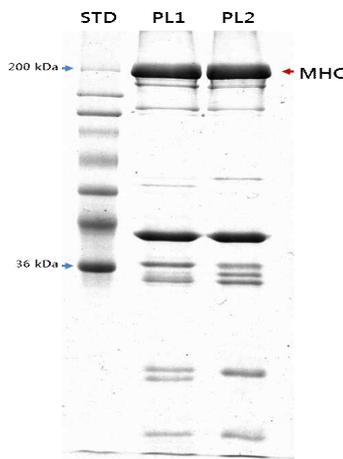


그림 4. 돼지 등심근의 1차원 전기영동 이미지.

- 표 3에 타나낸 바와 같이 돼지 등심근에 분포하는 4종의 마이오신 아형을 확인하였고, 각 isoform이 가지고 있는 특이적 peptide를 확인할 수 있었음.

표 3. 돼지 등심근의 myosin heavy chain(MHC) isoform

MHC name ^{a)}	Accession number ^{b)}	Species	Peptide size(aa) ^{c)}	Theoretical MW(Da) ^{d)}	Theoretical pI ^{e)}
Myosin, heavy chain 2 (IIA)	NP_999301.1	Sus scrofa	1939	223924	5.64
Myosin, heavy chain 1 (IIX)	NP_001098421.1	Sus scrofa	1939	223947	5.60
Myosin, heavy chain 4 (IIB)	NP_001116613.1	Sus scrofa	1937	224010	5.60
Myosin, heavy chain 7 (I/slow)	NP_999020.1	Sus scrofa	1935	223657	5.56

^{a),b)}Accession number and protein names were taken from the NCBI database.

^{c)}Peptide size(amino acids), (recorded in NCBI database).

^{d),e)}Theoretical molecular weight and pI(recorded in NCBI database).

- 각 isoform이 가지고 있는 고유의 peptides 중 대표적인 4 종류의 peptide를 표 4 및 그림 6에 나타내었음.

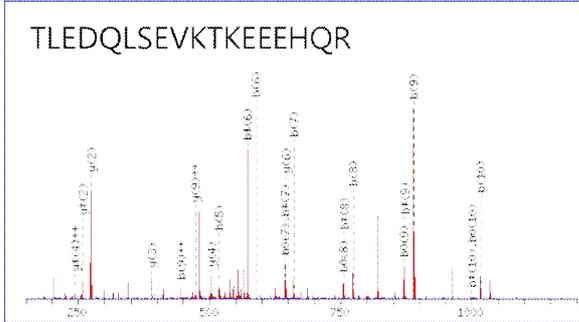
- “TLEDQLSEVKTKEEEHQR”, “ELEGVESEQKRNVEVTK”, “DIGTKGLNEE”, “TNAACAALDKK” 등은 MHC 1, 2, 7 및 4 고유의 peptide이며, 돼지 근육에서만 확인이 되는 마이오신 아형의 peptide marker가 될 수 있음.

표 4. 돼지 등심근의 LC-MS/MS를 통한 대표적인 펩타이드 분석

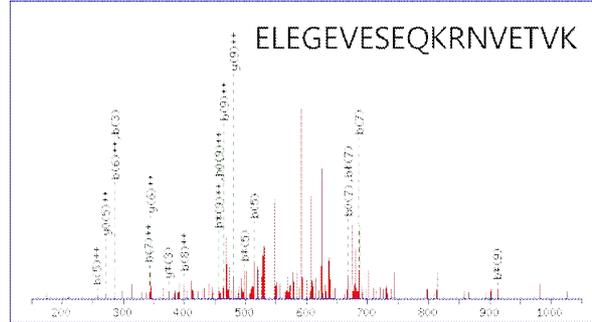
MHC ^{a)}	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Peptide
Myosin, heavy chain 2 (IIA)	733.7827	2198.3258	2199.3320	TLEDQLSEVKTKEEEHQR
Myosin, heavy chain 1 (IIX)	701.7778	2102.3113	2103.2448	ELEGVESEQKRNVEVTK
Myosin, heavy chain 4 (IIB)	538.5075	1075.0002	1075.1272	DIGTKGLNEE
Myosin, heavy chain 7 (I/slow)	582.3250	1162.6351	1162.3171	TNAACAALDKK

^{a)}Accession number and protein names were taken from the NCBI database.

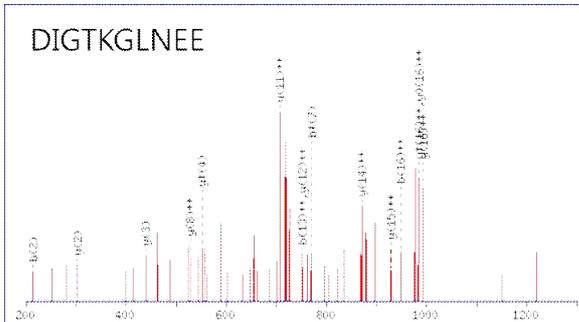
(A) MS/MS fragmentation of peptide of myosin-1



(B) MS/MS fragmentation of peptide of myosin-2



(C) MS/MS fragmentation of peptide of myosin-7



(D) MS/MS fragmentation of peptide of myosin-4

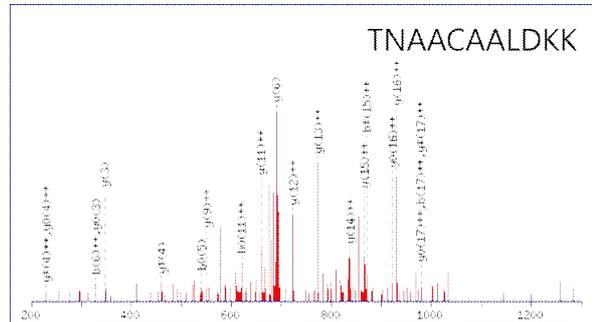


그림 6. 각 희귀 마이오신 아형의 LC/MS-MS 통한 대표적인 펩타이드의 단편 분석.

○ 소 등심근의 마이오신 아형(myosin heavy chain isoforms) 비교

- 소 등심근(*longissimus dorsi m.*)에서 추출한 단백질을 전기영동법으로 분리하여 마이오신 아형을 LC-MS/MS 분석을 실시함(그림 7).

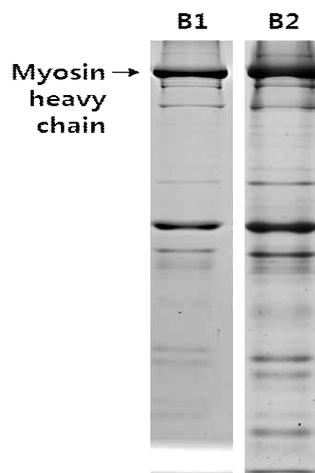


그림 7. 1차원 전기영동 결과.

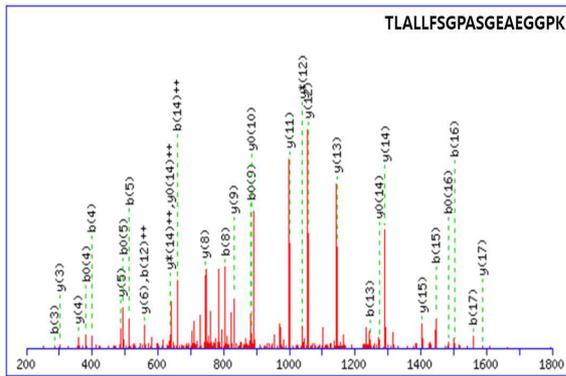
- 각 isoform이 가지고 있는 고유의 peptides 중 대표적인 4 종류의 peptide를 표 5 및 그림 8에 나타내었음.

- “TLALLFSGPASGEAEGGPK”, “QAEAEQSNLTKFR”, “SNAAAAALDKK”, “GQTVQVYNAVGALAK” 등은 MHC 1, 2, 7 및 4 고유의 peptide이며, 소 근육에서만 확인이 되는 마이오신 아형의 peptide marker가 될 수 있음.

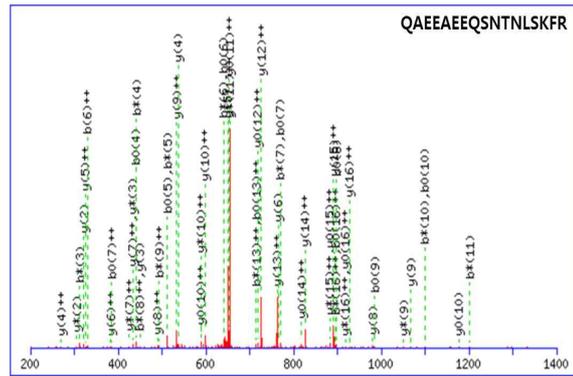
표 5. 소 등심근에서 확인된 단백질 결과

Protein name ^{a)}	Accession number ^{a)}	Species	Theoretical MW (Da)/pI ^{b)}	Sequence coverage (%)	Queries matched	Queries with identify ^{c)}
Myosin-1 (MHC 2x)	gi 21743235	Bos taurus	223,900/5.57	49	524	63
Myosin-2 (MHC 2a)	gi 261245063	Bos taurus	224,243/5.63	45	397	45
Myosin-7 (MHC slow)	gi 13560273	Bos taurus	224,026/5.58	37	225	29
Myosin-4 (MHC 2b)	gi 296476617	Bos taurus	223,875/5.62	33	263	29

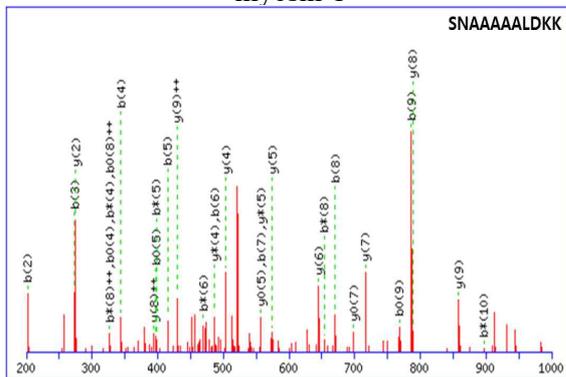
- a) Protein names and accession numbers were taken from the NCBI database.
- b) Theoretical molecular weight and pI(recorded in NCBI database).
- c) Individual ions scores > 43 indicate identity(p<0.05).



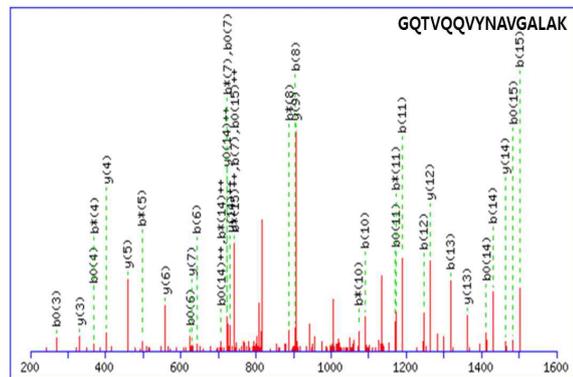
(A) MS/MS fragmentation of peptide of myosin-1



(B) MS/MS fragmentation of peptide of myosin-2



(C) MS/MS fragmentation of peptide of myosin-7



(D) MS/MS fragmentation of peptide of myosin-4

그림 8. 주요 마이오신 펩타이드의 특이적 단편.

▶ 2차원 전기영동법과 질량분석법(Maldi-Tof/Tof)을 통한 주요 축종 간 상이적 발현 단백질 비교

- 돼지 등심근 및 오리 흉근으로부터 추출한 단백질 분석 실시
- pH3-10(18cm) IPG strip으로 1차 분리 후 SDS-PAGE로 2차 분리 실시(그림 9).

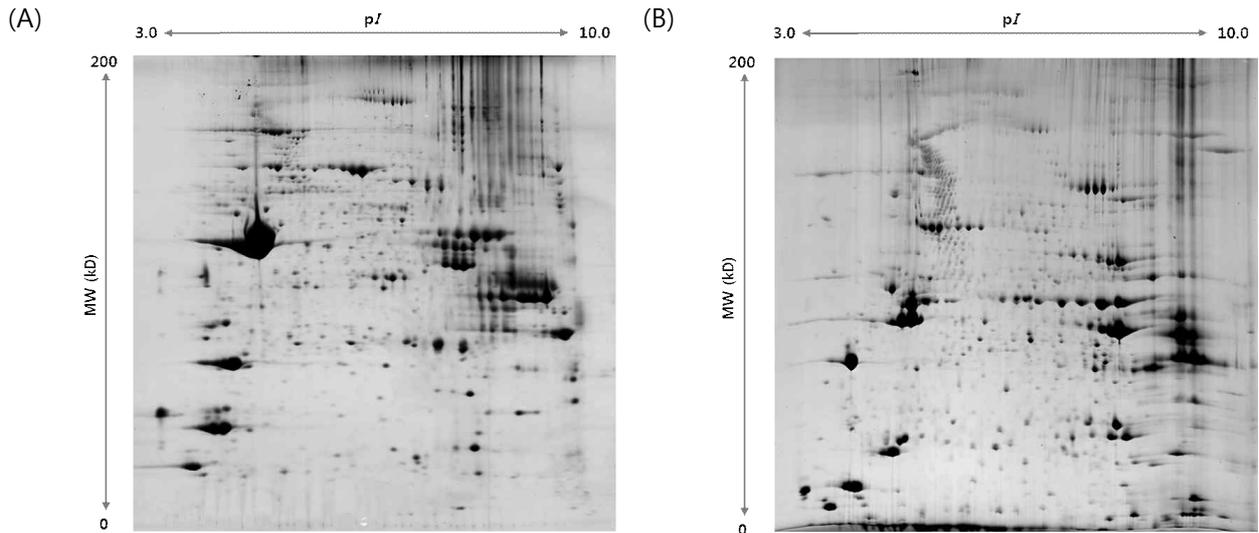


그림 9. 돼지 등심근 및 오리 흉근의 2차원 전기영동 결과.

- 시장 조사
- 경남 주요 도시의 대형마트를 방문하여 현 시판되는 육제품 시장조사를 실시함.

A도시 - 품목 : 소시지

동원	세이브	초이스엘	롯데햄	롯데
통그릴 볼 비엔나	옛맛 소시지	그릴 비엔나	키스틱	푸드 엔네이처 볼비엔나
돼지고기	연육, 돼지고기	돼지고기	연육	돼지고기
정제수	옥수수전분	정제수	돼지고기	정제수
백설탕	중력분	대두단백	소맥전분	소맥전분
대두단백	정제소금	정제소금	체다치즈	농축대두단백
정제소금	대두단백	설탕	피코쇼트닝	정제소금
복합스파이스	백설탕	산도조절제	백설탕	백설탕
분말난백	에리소르빈산 나트륨	블랙페퍼	KST시즈닝	볶음양파시즈닝
카라기난	합성착색료	그릴소시지시즈닝	정제소금	무안양파
폴리인산나트륨	복합조미식품	팬솔트	폴리인산나트륨	샐러리분말
산도조절제	L-글루타민산 나트륨	마늘분말	피로인산나트륨	산도저절제
락색소	화이버겔	비타민 C	치즈시즈닝분말	비타민C
아질산나트륨	산도조절제	아질산나트륨	치즈후레바	너트매그코팅
메타인산나트륨			혼합제제	천연색소
피로인산나트륨				

A도시 - 품목 : 햄

롯데	롯데햄	롯데마트	사조 안심팜	농심
의성마늘햄	로스팜	통큰 탐라팜	안심팜	틀립햄클래식
돼지고기	돼지고기	돼지고기	돼지고기	돼지고기
정제수	정제수	정제수	정제수	정제염
전분	정제소금	정제소금	천일염	정백당
마늘햄씨즈닝	백설탕	소맥전분	백설탕	제삼인산나트륨
L-글루타민산나트륨	셀러리분말	오니언씨즈닝	VEGE890	스파이츄출물
마늘햄염지제	산도조절제	자색양파분말	카라기난	양파파우더
산도조절제	비타민C	산도조절제	콜라겐파우더	L-아스코르빈산 나트륨
난백분		아질산나트륨	L-글루타민산나트륨	아질산나트륨
농축대두단백		L-아스코르빈산 나트륨	호스이엔말	
의성마늘			비타민C	
락색소			아질산나트륨	
아질산나트륨				

A도시 - 품목 : 떡갈비류

롯데햄	모닝하임	한성기업	아워홈
담양덧잎 떡갈비	입격정 떡갈비	프리미엄 고기산적	손수 다져만든 함박스테이크
돼지고기	돼지갈비살	돼지고기	돼지고기
전통떡갈비양념	소고기	사과퓨레	양파
대두	닭고기	비타민C	정제수
밀	흑설탕	배퓨레	두류가공품
백설탕	불고기양념장S	백설탕	난백액
물엿	대두단백	대두유	케이에스피
양파	대과	마늘	건빵가루
숯불갈비맛엑기스	양조간장	양파	옥수수전분
정제수	양파	대과	스테이크업헨서
두부	옥수수전분	간장	함수결정포도당
양파	맥아물엿	대두단백	혼합제제
대과	마늘	숯불갈비맛엑기스	증점제
떡갈비맛내기	쇠고기엑기스S	생강	구아검
조식대두단백	비타셀WF200	정제소금	황산칼슘
농축대두단백	참기름	흑후추분말	정제염
밀식이점유	산도조절제	카라멜색소	정백당
마늘	정제소금	너트메그분말	혼합탈지분유
담양대나무잎	코지원케이피2000		카라기난
체종유	차콜그릴용씨즈닝S		후추가루
	흑후추		카라멜색소
	카라멜색소		효모추출물
			로즈마리분말
			너트맥분말

B도시 - 품목 : 소시지

주부9단	동원	백설	존쿡	존쿡
비엔나소시지	델립비엔나	추억의 알찬소시지	세블락소시지	뉴른베르거소시 지
돼지고기	돼지고기	연육	돼지고기	돼지고기
정제수	정제수	소맥전분	정제수	정제수
대두단백	전분	돼지고기	정제염	정제염
정제소금	복합스파이스	밀가루	블렌디드시즈닝	블렌디드시즈닝
백설탕	대두단백	정제소금	향미증진제	백설탕
비엔나 복합스파이스	정제소금	분리대두단백	콜라겐	콜라겐
산도조절제	백설탕	복합향신료	보로나시즈닝	케이준윈너시즈닝
L-글루타민산나트 륨	유청분말	백설탕	산도조절제	산도조절제
자몽종자추출물	카라기난	L-글루타민산나트 륨	알긴산나트륨	마조람
코치닐추출색소	혼합제제	코치닐추출색소	아질산나트륨	비타민C
비타민C	산도조절제	산도조절제	돈장	코치닐추출색소
아질산나트륨	비타민C	파프리카추출색소	포도당시럽	산도조절제
콜라겐케이싱	락색소(천연색소)			아질산나트륨
	아질산나트륨			돈장
	콜라겐케이싱			

B도시 - 품목 : 햄

목우촌	델립	존쿡	존쿡	청정원
주부9단 살코기햄	와인갈릭햄	엑스트라린 햄	치킨브레스트햄	참작참나무훈연 구이햄
돼지고기	돼지고기	돼지고기	닭고기	돼지고기
정제수	정제수	정제수	정제수	정제수
대두단백	전분	엑스웰시즈닝	물엿	전분
백설탕	동결단백	쇠고기	백설탕	대두단백
정제소금	복합스파이스DW WG	혼합시즈닝	정제염	정제소금
산도조절제	L-글루타민산나트륨	자가분해효모추출물	비앙드50에스	콜라겐
페파스파이스로얄	대두단백	L-글루타민산나트륨	대두단백	백설탕
비프인헨사	정제소금	정제염	이산화규소	혼합제제
코치닐추출색소	백설탕	산도조절제	복합스파이스에스- 1	복합향신료DS-8
L-글루타민산나트 륨	폴리인산나트륨, 폴리인산나트륨	햄스파이스메스	향신료	L-글루타민산나트 륨
비타민C	적포도주	코치닐추출색소	비타민C	비프분말S-101
아질산나트륨	갈릭농축액	아질산나트륨	스모크오일	파라기린
	마늘		아질산나트륨	코치닐추출색소
	락색소		대두유	비타민C
	비타민C			자몽종자추출물
	아질산나트륨			아질산나트륨
	메타인산나트륨			텍스트린
	피로인산나트륨			

B도시 - 품목 : 기타 혼합육제품류

백설햄 불고기맛 핫바	텔립그릴후랑크	핫 소프레세타 살라미	존쿡 살라미
돼지고기	돼지고기	돼지고기	돼지고기
정제수	정제수	소금	정제염
옥수수전분	소맥전분	설탕	메디테란 스파이스
난백액분말	대두단백	고춧가루	산도조절제
결정포도당	정제소금	파프리카	코치닐추출색소
백설탕	복합스파이스DWF	셀러리파우더	유산균
불고기용시즈닝	L-글루타민산나트륨	흑후추	아질산나트륨
글루타민산나트륨	백설탕	마늘	
이산화규소	피로인산나트륨	백후추	
산도조절제	카라기난	젖산발효균	
분리대두단백	락색소		
혼합제아질산나트륨	아질산나트륨		
발색제(합성보존료)	콜라겐케이싱		
복합스파이스CC	폴리인산나트륨		
참기름	메타인산나트륨		
혼합제제밀토크스트린			
설롯향이산화규소			
락색소			
혼합제제고량색소이나 토색소			
글리세린			
홍국적색소			
아스코르빈산나트륨			

C도시 - 품목 : 혼합스테이크 및 기타 육제품류

CJ 더 건강한 그릴스테이크	진주햄 켄터키 후랑크	CJ 더 건강한 베이컨 스테이크	청정원 크런치통살 치킨너겟
돼지고기	돼지고기	돼지고기	닭고기
천일염	닭고기	정제수	정제수
백설탕	정제수	천일염	너겟용브레딩믹스
발효펩타이드프로유	전분	백설탕	전란분
혼합제제	대두단백	발효펩타이드프로유	정제염
셀러리주스건조	정제소금	산도조절제	불활성건조효모
난백분말	복합스파이스에스-3	셀러리주스건조	배터믹스-YM
스모크후레바	에이스타	사과농축	옥수수전분
카라기난	복합스파이스엘-1	스모크후레바	식물성오일-HS
비타민C	액티브파우더-5	L-아스코르빈산나트륨	프리더스트알
자몽종자추출물	푸랑크푸르터향신조미료	자몽종자추출물	백설탕
야채발효균	폴리인산나트륨	코치닐추출색소	치킨맛분말
코치닐추출색소	소르빈산칼륨	야채발효균	대두단백
유화제	락색소		천일염
스모크향	아질산나트륨		활성글루텐
	피로인산나트륨		혼합제제
	메타인산나트륨		너겟시즈닝M
			L-글루타민산나트륨

C 도시- 품목 : 햄

진주햄	청정원	본엠펜	프레스리안	프레스리안
더블 스모크 불고기햄	건강생각 라운드햄	도이치햄	더 건강한햄 의성마늘	샌드위치햄
돼지고기	돼지고기	돼지고기	돼지고기	돼지고기
닭고기	난백분말	정제수	정제수	정제수
정제수	대두단백	정백당	분리대두단백	백설탕
옥수수전분	천일염	대두단백	의성마늘	분말.결정포도당
대두단백	백설탕	정제소금	백설탕	정제소금
중력분	복합유산균분말	복합스파이스DWP	비프소스	난백분말
정제소금	적색무분말	녹차농축액	산도조절제	텍스트린,
설탕	분말양파	분말난백	셀러리쥬스파우더	마늘씨즈닝
아질산나트륨	분말마늘	L-글루타민산나트륨	마늘햄용시즈닝2	분리대두단백
소르빈산칼륨	겨자분말	천연색소	야채발효균	카라멜색소
에리쓰르빈산나트륨	DHA분말	아질산나트륨	혼합제제	아질산나트륨
코치닐추출색소	초유단백분획물		분말.결정포도당	양파시즈닝
L-글루타민산나트륨	조미원후추분말		천일염	락색소
복합조미식품	너트맥분말		코치닐추출색소	참기름
산도조절제	미트인헨서		유청분말	카라기난
합성착향료	바이텍에스		복합스파이스AF7	페퍼로얄
프리젤리	비타민C		발효펩타이드프로유,	핫케익가루
	혼합제제		난백분말	산도조절제
	코치닐추출색소		카라기난	L-글루타민산나트륨
				L-아스코르빈산나트륨

- 시장조사 결과, 육제품은 제조시 원료육인 돈육, 연육 및 계육을 제외하고도 전분, 난백 등 식감 증진효과, 원가절감 등의 이유로 비육단백질이 첨가되어 판매되고 있음.

- 육제품에 표기되는 성분표에서 첨가성분은 확인이 가능하지만 첨가함량은 알 수 없음. 따라서 육제품 내에 육단백질 및 비육단백질 및 축종식별이 가능한 단백질 특이성을 구명할 계획임.

▶ 가열한 원료육의 단백질 분석 및 신선육과 비교하여 종 특이 단백질의 열처리에 따른 변이 및 정성 확인

○ 축종간 단백질 비교(신선육)

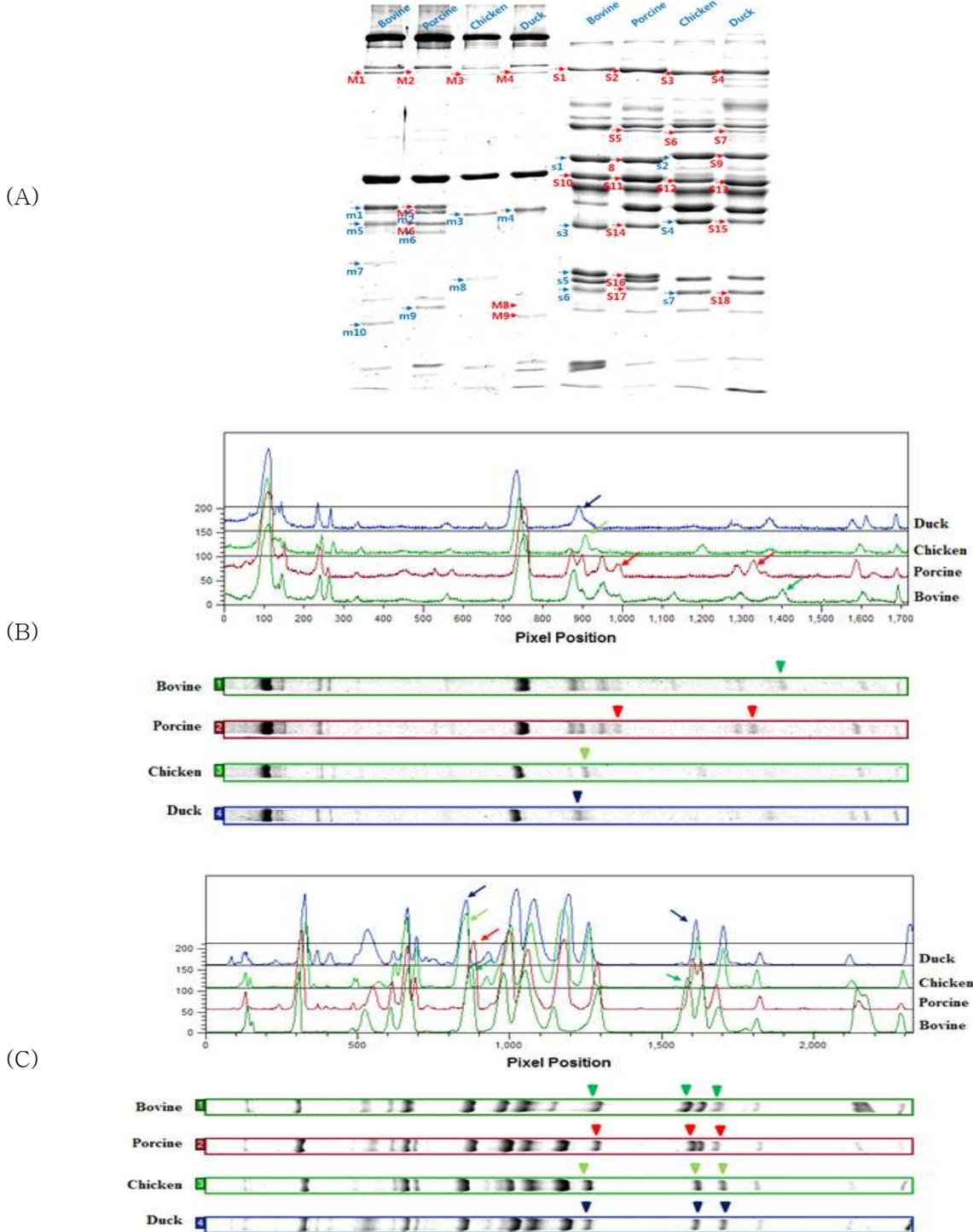


그림 10. 우육, 돈육, 계육 및 오리육의 신선육 단백질 1차원 전기영동 결과 및 이미지 분석 결과 (A : 1차원 전기영동 결과, B : 근원섬유단백질 이미지 분석 결과, C : 근장단백질 이미지 분석 결과)

- 주요 식육(우육 등심, 돈육 등심, 계육 흉근, 오리육 흉근)의 근원섬유단백질 및 근장 단백질을 구분하여 비교한 결과 우육과 돈육은 서로 비슷한 단백질 분포를 나타내었고, 가금육인 계육과 오리육도 서로 비슷한 단백질 분포를 나타내었음(그림 10).
- 포유류와 가금류로 구분되는 분명한 단백질 분리 경향을 확인할 수 있었는데, 그림에서 나타낸 바와 같이 m1 및 M5는 우육과 돈육에서 공통으로 확인되는 Tropomyosin 단백질이며, m3 및 m4는 계육 및 오리육에서 확인되는 Tropomyosin 단백질임.
- 동일한 단백질임에도 불구하고 포유류와 가금류에서 단백질 분리 패턴이 상이한 경향을 나타낸 것을 확인할 수 있음.
- 이러한 분리 패턴은 근장단백질 분석에서도 확인할 수 있는데, s1 및 S8은 각각 우육과 돈육에서 확인된 Enolase 단백질인데, 이 단백질 또한 가금류인 계육 및 오리육에서도 각각 확인되었으나 겔 위치상 다른 부분에 분리된 것을 확인할 수 있음.
- 이미지 분석 결과에서도 각각 다른 위치에 피크가 확인(화살표)되었으며, 이러한 분석결과는 신선육 상태에서 각 축종의 판별을 위한 마커로 활용이 가능할 수 있을 것으로 판단됨.

표 6. 주요 식육의 근원섬유단백질의 질량분석(LC-MS/MS) 결과 확인된 단백질

Bands	Protein name
m1	Tropomyosin 2
m2	Troponin T fast skeletal muscle type
m3	Alpha- tropomyosin
m4	Tropomyosin alpha-4 chain isoform X7
m5	Tropomyosin 1
m6	Troponin T fast skeletal muscle type
m7	Troponin T fast skeletal muscle type
m8	Troponin Tnt-2
m9	Troponin I
m10	Troponin I type 2
M1	Phosphorylase
M2	Phosphorylase
M3	Phosphorylase
M4	Alpha subunit of beta conglycinin
M5	Tropomyosin beta chain
M6	Tropomyosin alpha chain-1
M7	Myosin light chain 1 skeletal muscle isoform
M8	Troponin I, fast skeletal muscle

Protein scores greater than 83 are significant (p<0.05).

표 7. 주요 식육의 근장단백질의 질량분석(LC-MS/MS) 결과 확인된 단백질

Bands	Protein name
s1	Enolase 3
s2	Enolase
s3	L-lactate dehydrogenase A chain
s4	Type II alpha-keratin IIC
s5	Carbonic anhydrase III, muscle specific
s6	Triosephosphate isomerase 1
s7	Chain A structure of triose phosphate isomerase
S1	Unidentified (protein score < 83)
S2	Unidentified (protein score < 83)
S3	Phosphorylase
S4	Unidentified (protein score < 83)
S5	Unidentified (protein score < 83)
S6	Glucose-6-phosphate isomerase
S7	Glucose-6-phosphate isomerase
S8	Beta-enolase
S9	Unidentified (protein score < 83)
S10	Creatine kinase M-type
S11	Unidentified (protein score < 83)
S12	Unidentified (protein score < 83)
S13	Creatine kinase M-type
S14	Unidentified (protein score < 83)
S15	L-lactate dehydrogenase
S16	Carbonic anhydrase
S17	Triosephosphate isomerase
S18	Unidentified (protein score < 83)

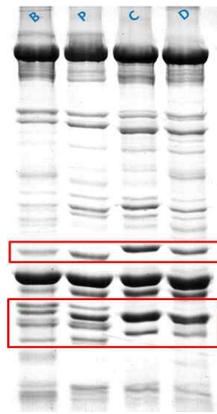
Protein scores greater than 83 are significant ($p < 0.05$).

○ 축종간 단백질 비교(가열육)

- 주요 4종의 식육은 신선육 상태의 단백질 분석 결과와 같이 가열처리(70°C, 30분)하여 1차원 전기영동법으로 분석하였는데, 특정 부분의 단백질에서 축종별로 다른 단백질 분포를 보인 것을 확인할 수 있었음(그림 11).

- 근원섬유단백질은 신선육상태와 거의 동일한 단백질의 분포를 보이지만 근장단백질은 가열에 의해 변성되어 대부분 1차원 전기영동 상에서 사라짐. 그러므로 근장단백질보다는 근원섬유단백질을 활용하여 축육을 판별하는 것이 옳다고 판단됨.

(A)



(B)

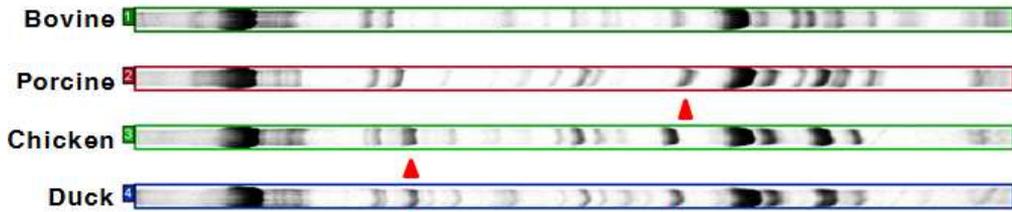
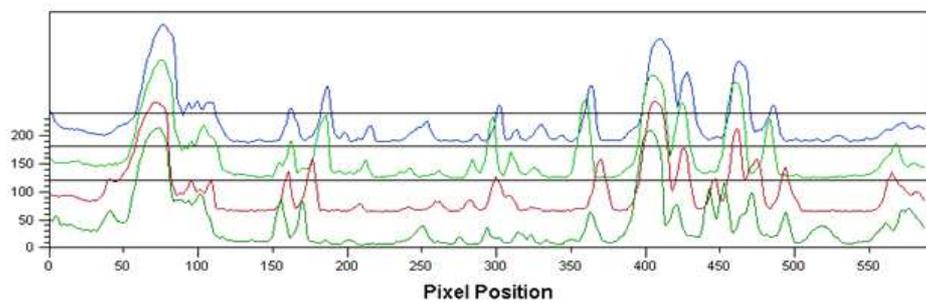


그림 11. 우육, 돈육, 계육 및 오리육의 가열육 단백질 1차원 전기영동 결과 및 이미지 분석 결과.

▶ 비육단백질(non-meat protein)로 이용되는 대두단백과 난백의 특이 단백질을 탐색하여 제품 내 정성확인 조건 탐색

- 주요 육제품 원료육인 우육, 돈육, 계육 및 오리육과 함께 육제품의 품질 개선을 위해 사용되는 대표적인 비육단백질인 대두단백, 난백, 유청 및 어육을 1차원 전기영동법으로 비교함(그림 12).

- 비육단백질에서 확인되는 단백질 밴드는 특징적인 경향을 나타내었으나 대부분 식육 단백질과 동일한 위치로 분리되어 1차원 전기영동 및 이미지 분석으로 구분하기가 어려울 것으로 사료됨.

- 유청 및 대두단백 일부 밴드에서 식육 단백질과 확연히 구분되었으나 난백의 경우 식육 단백질과 구분되는 밴드는 없음.

- 따라서 본 연구에서는 주요 식육으로부터 추출한 단백질을 1차원 전기영동법으로 분리하여 각 축종별 특이적인 단백질을 확인한 바, 추가적인 항원-항체 반응을 통해 구분이 가능할 것으로 판단됨.

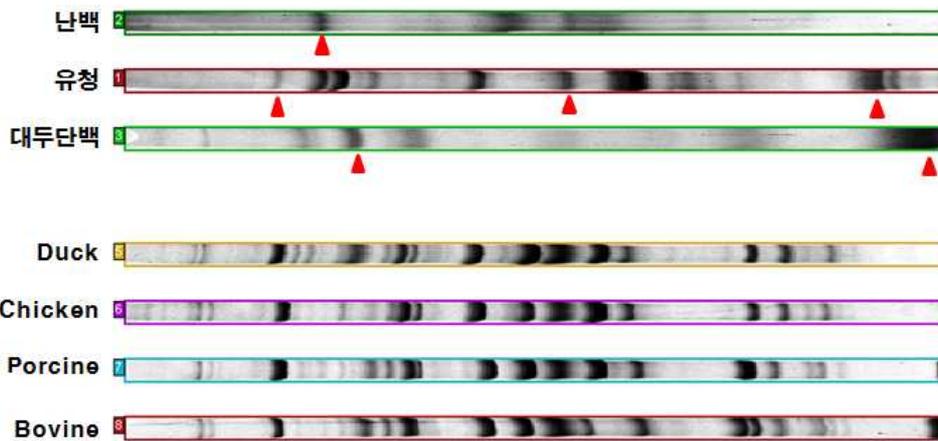
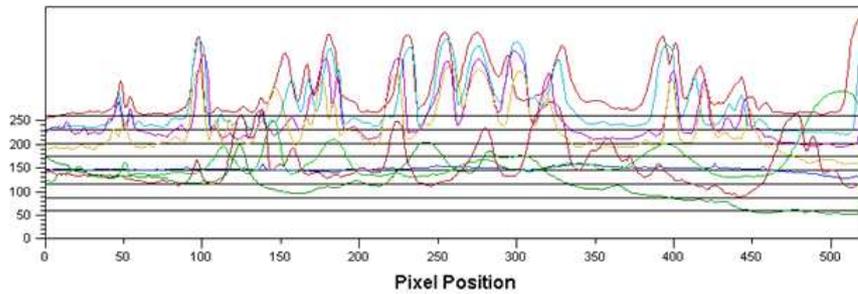
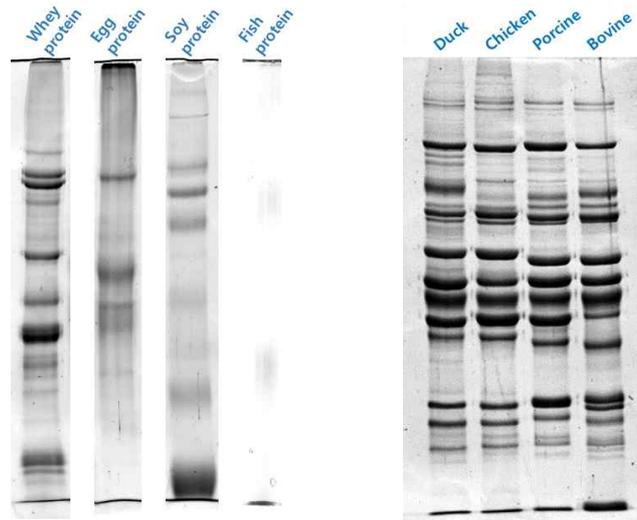


그림 12. 비육단백질 3종과 식육단백질 4종의 1차원 전기영동 결과 및 이미지 분석 결과.

▶ **질량분석을 통한 대표적인 비육단백질(non-meat protein)의 특이 단백질 정성 확인**

- 앞선 연구 결과를 활용하여 육제품 제조 시 품질을 개선하기 위해 사용되는 대표적인 비육단백질인 유청, 대두단백, 난백 및 어육단백질의 정성을 확인함(그림 13).
- 육제품 제조 시 사용되는 비육단백질의 형태는 대부분 공정을 거친 분말형태 또는 냉동 상태로 장기간 저장이용이 가능한 형태로 사용됨.
- 그래서 전기영동 상에서 단백질변성이 많이 일어나 식육에 비해 적은 단백질들이 확인 됨.

- 마찬가지로 질량분석(LC-MS/MS)을 통해 비육단백질들의 정성확인을 해본 결과 식육단백질들과는 전혀 다른 단백질들이 확인되고 있지만 종류는 식육에 비해 적었음.
- 그러므로 제품 내에서 표 8에 나타난 단백질들이 질량분석을 통해 확인된다면 식육단백질 및 비육단백질의 식별이 가능할 것으로 판단됨.

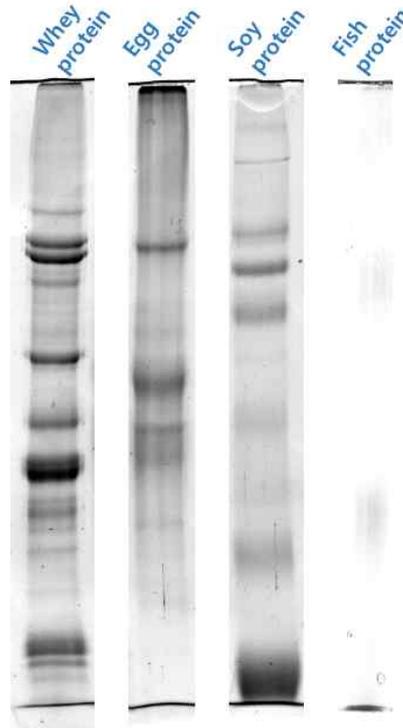


그림 13. 비육단백질의 1차원 전기영동 분석 결과.

표 8. 주요 비육단백질 질량분석(LC-MS/MS) 결과 확인된 단백질

Group	Protein name
Whey	Bovine albumin serum
Whey	PAS-6 and PAS-7 proteins
Egg	Ovotransferrin CC type
Egg	Ovalbumin
Soy	Alpha' subunit of beta-conglycinin, partial
Soy	Lipoxygenase-3
Fish	Parvalbumin, partial
Fish	Calmodulin

Protein scores greater than 83 are significant(p<0.05).

▶ **분쇄, 혼합 등 제조공정을 통해 축육 및 비육단백질(non-meat protein)의 특이 단백질변성 및 정성 확인**

○ 혼합된 축육 단백질의 구분

- 주요 식육 4종이 2종, 3종 및 4종 혼합되었을 경우 혼합된 축육을 판별하기 위한 방법으로 각 축육이 나타내는 특이적 단백질 분리 패턴과 각 축육 판별 마커를 활용한 방법임.
- 혼합된 식육의 근원섬유단백질을 분석한 결과, 돈육의 경우 그림 14-A에서 MP2가 특이성을 나타내었는데, 이 단백질은 Troponin I 단백질로 축종에 따른 이성체 중 돈육의 특이적 이성체로 확인됨.
- 따라서 MP2 밴드가 확인되는 시료는 돈육이 혼합되어 있음을 확인할 수 있음. 이러한 방법으로 MP1, MB1 및 MC1은 각각 돈육, 우육 및 계육을 확인하는 단백질 마커가 됨을 알 수 있음.
- 근원섬유단백질의 결과와 같이 근장 단백질의 결과에서도 그림 14-B의 SB1, SB2, SB3, SB4, SC1, SC2 및 SC3가 각각 축종을 판별하는 마커가 될 수 있으나, 근장단백질은 포유류와 가금류를 구분하는 단백질이 다수임.
- 동일한 단백질로 확인되나 포유류 또는 가금류에 따라 다른 위치에 분포하는 것으로 확인되었으며, 혼합된 식육에서도 동일한 패턴을 보였음. 따라서 근장단백질은 각 축육을 구분보다는 포유류와 가금류를 구분하는 마커로 활용하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.

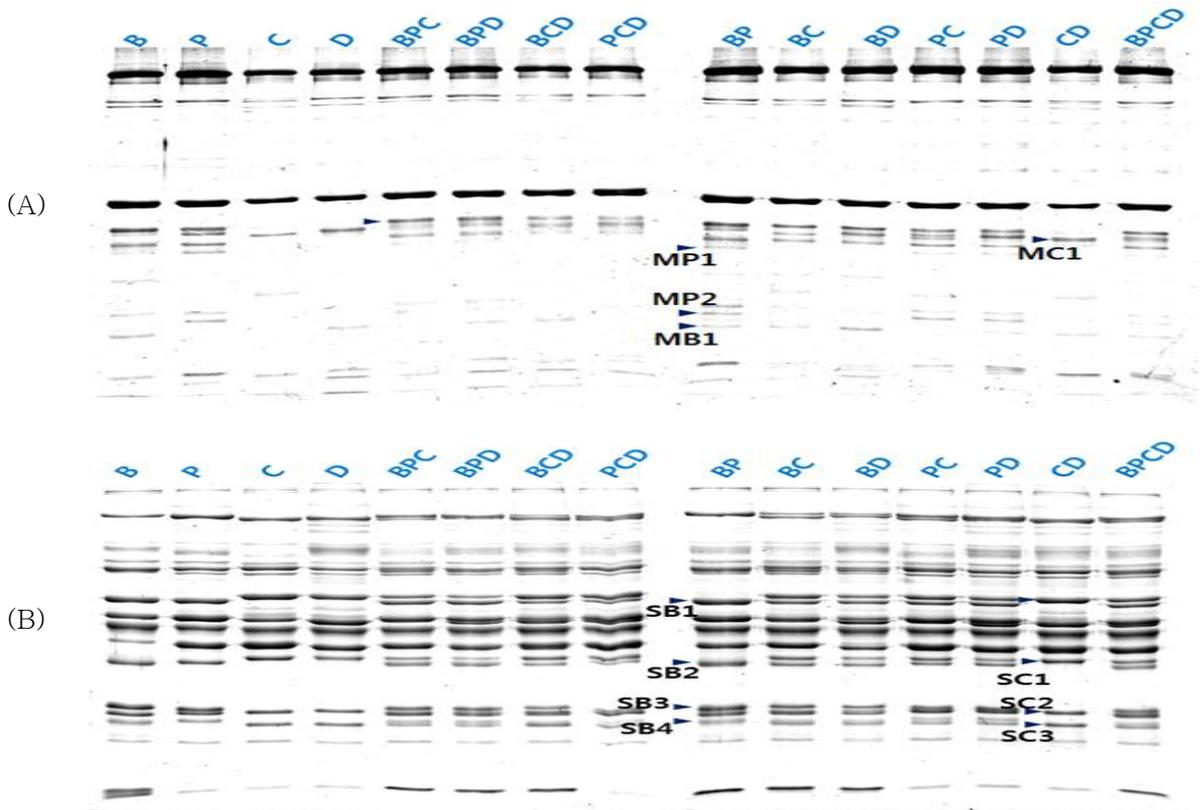


그림 14. 우육, 돈육, 계육 및 오리육을 혼합한 후 1차원 전기영동 분석한 결과(A : 근원섬유단백질, B : 근장단백질).

○ 혼합된 식육을 이용한 유화형소시지 분석

- 4종의 식육을 2종씩 혼합하여 제조한 유화형소시지의 단백질을 추출하여 1차원 전기영동법으로 분석한 결과 일부 단백질에서 상이한 분포 패턴을 나타내었음(그림 15).
- 그러나 포유류와 가금류를 구분할 수 있는 단백질 분포 패턴을 확인 할 수 있으나, 각 4종의 축종을 구분하는 분포 패턴은 확인되지 않았음.
- 이러한 결과는 추가적인 항원-항체 반응을 통하여 종 특이적 단백질 이성체의 확인으로 보완이 가능할 것으로 판단됨.

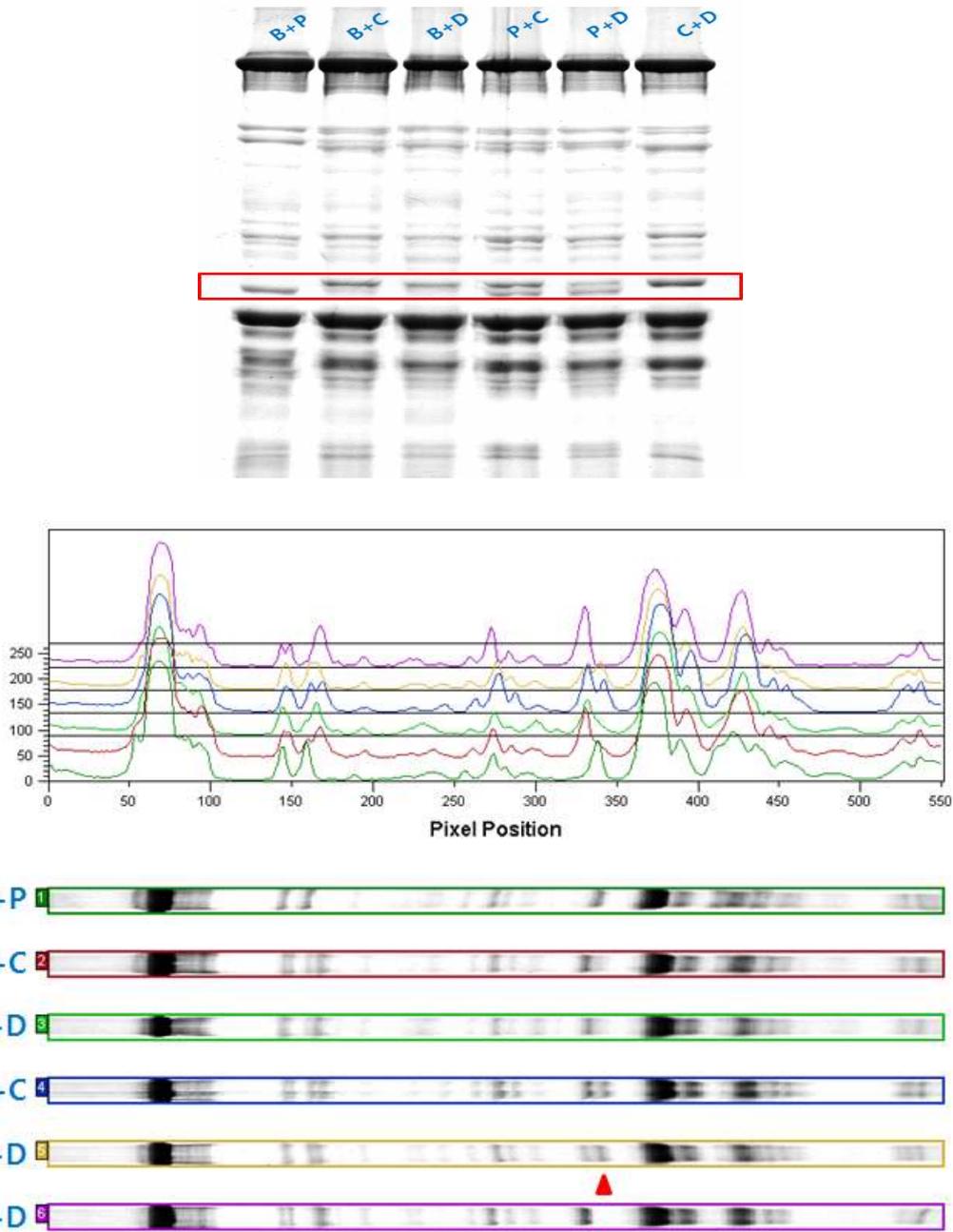


그림 15. 우육, 돈육, 계육 및 오리육을 혼합한 유화형소시지의 1차원 전기영동 및 이미지 분석 결과.

▶ **질량분석을 통해 제품 내 축육별 중 특이 단백질의 정량분석 최적화 적립**

- 원료육 정량 평가를 위한 분석법 기술개발 및 현장적용 가능성 확인
 - 정량 분석의 가능성을 확인하기 위해 질량분석을 통해 확인된 원료육의 특이 단백질을 활용하여 정량분석을 실시함.
 - 정량 분석을 위해 축종 및 비육단백질의 농도가 다른 샘플을 1차원 전기영동 분석 및 이미지 분석을 실시함(그림 16).
 - 분석 결과, 1차원 전기영동 상에 단백질의 농도에 따라 질량분석을 통해 특이 단백질로 확인된 밴드의 밀도가 다름. 또한 이미지 분석 결과 농도가 높아질수록 전기영동 상에 나타나는 모든 밴드의 pixel의 밀도가 높아짐.
 - 그러므로 1차원 전기영동 및 이미지 분석을 활용하여 정량평가가 가능 할 것으로 판단됨.
 - 항원-항체 반응을 통하여 특이 단백질을 이용하면 정량평가의 신뢰도를 높일 수 있을 것으로 판단됨.



그림 16. 축종별 1차원 전기영동 분석 및 이미지 분석 결과.

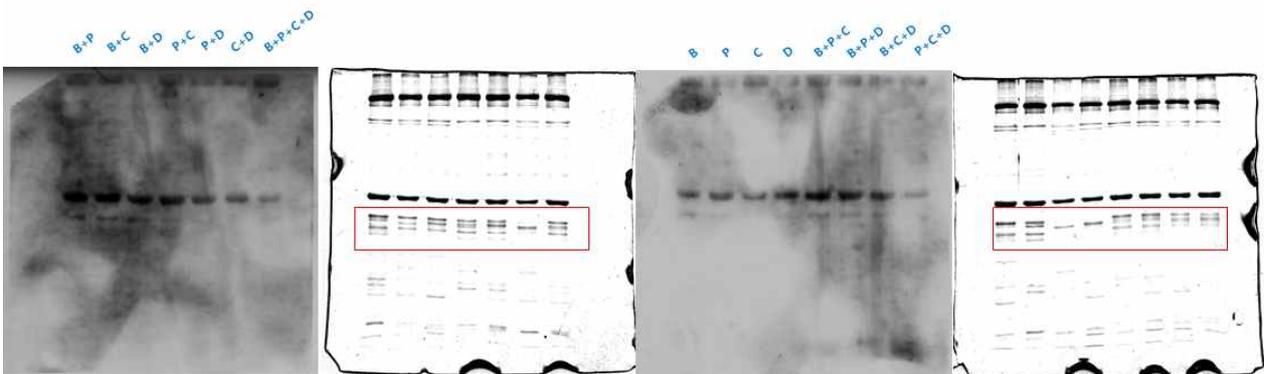
▶ **육제품의 품질설정을 위해 최종제품의 원료육 및 함량 분석 가능한 기술 개발**

- 원료육 정성 분석 기술 최적화
- 비가열 제품
 - 4종의 원료육을 단일 및 혼합의 형태로 제조하여 분석함.
 - 단백질은 항원결정기(epitope)를 가지고 있음. 이 항원결정기는 단백질마다 특이적으로 차이가 있으므로 이를 활용하면 특정 단백질의 검출이 가능함.
 - 그러므로 1차원 전기영동, 이미지분석 및 질량분석(LC-MS/MS) 결과를 바탕으로 원료육의 특이적인 단백질의 항원-항체 반응을 통해 식별을 실시함.
 - 항원-항체 반응을 위해 항체는 표 9에 나타난 단백질에 맞는 항체를 사용함.

표 9. 질량분석을 이용한 원료육 종류별 특이적 단백질

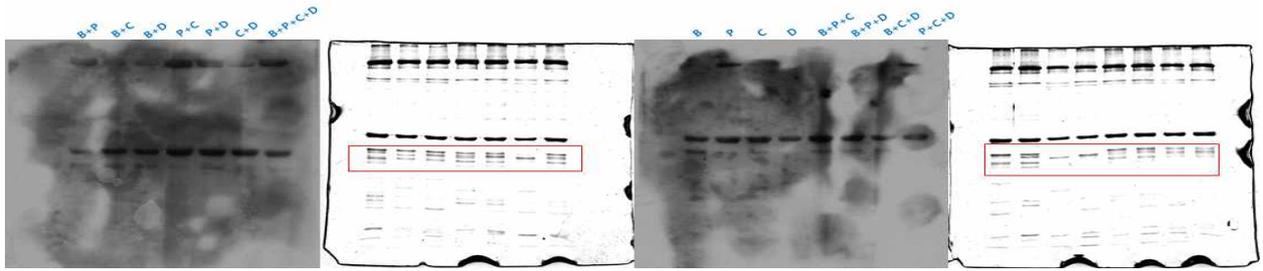
	Myofibrillar protein	Sarcoplasmic protein
Protein name	Tropomyosin	Carbonic anhydrase 3
	Tropomyosin a	Enolase
	Troponin I	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
	Troponin T	Glycogen phosphorylase
		L-lactate dehydrogenase (LDH)
		Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)

▷ Tropomyosin

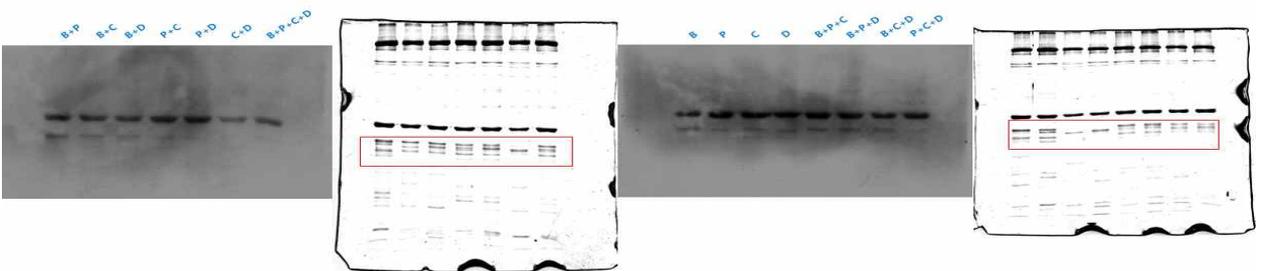


B: bovine, P: porcine, C: chicken, D: duck.

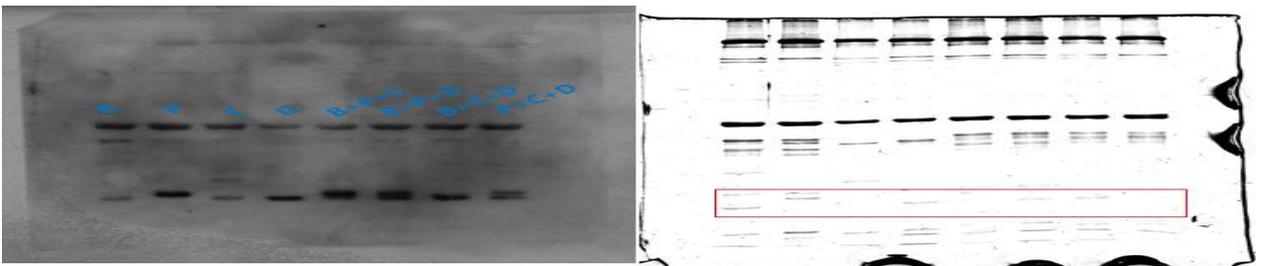
▷ Tropomyosin a



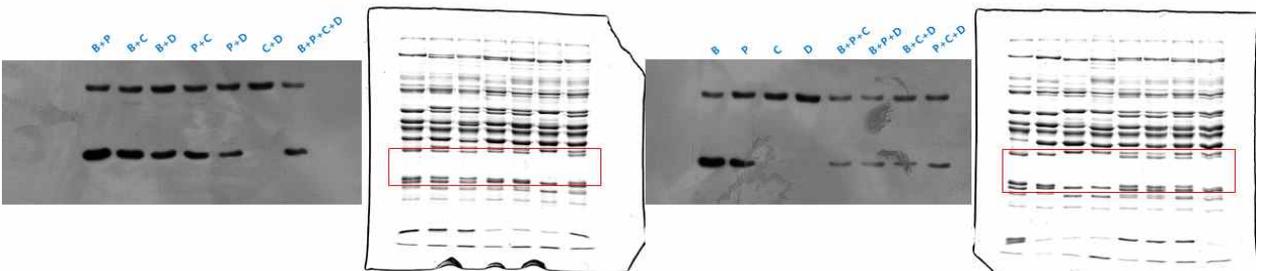
▷ Troponin T



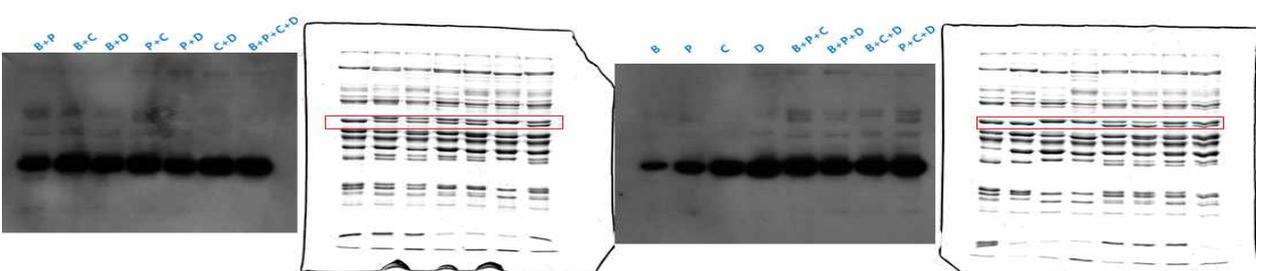
▷ Troponin I



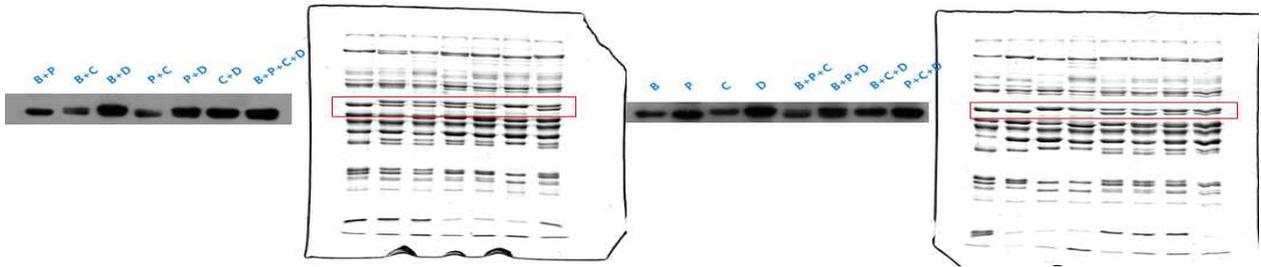
▷ Carbonic anhydrase 3



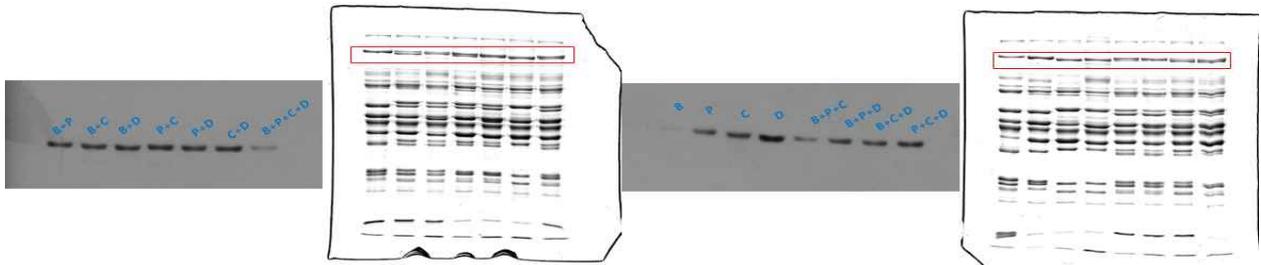
▷ Enolase



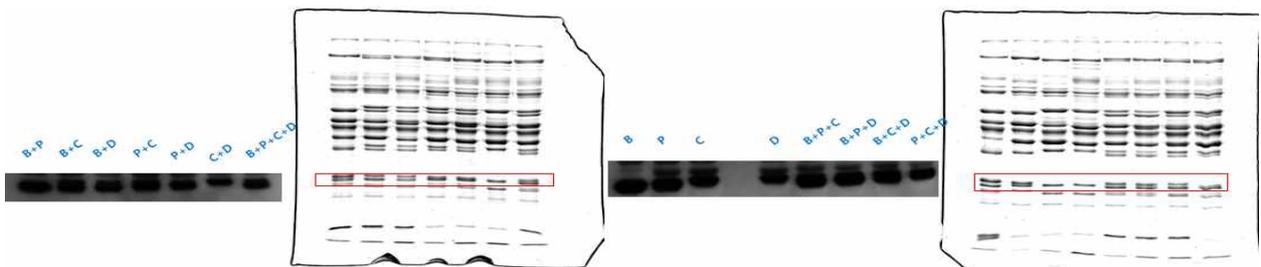
▷ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



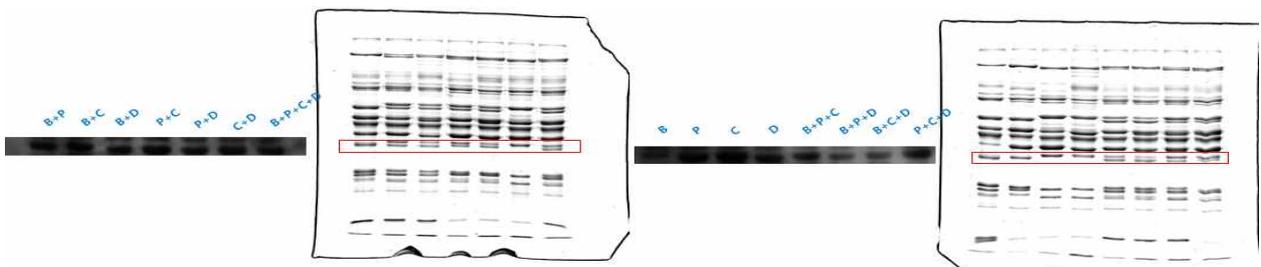
▷ Glycogen phosphorylase



▷ Glucose 6 phosphate isomerase



▷ L-lactate dehydrogenase



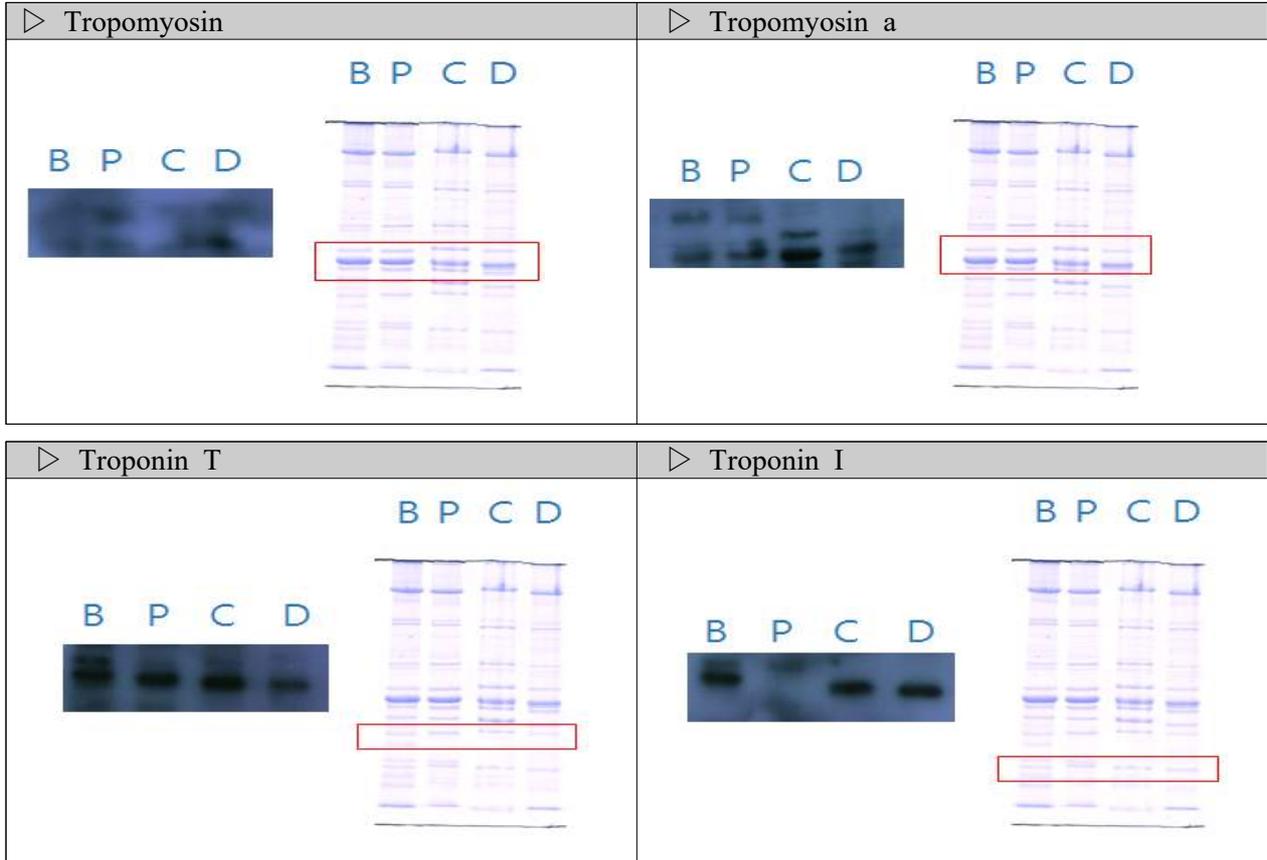
- 항원-항체 반응 결과, 활용되었던 단백질들은 축종에 따라 발현의 차이가 존재함. 예를 들어 항원-항체의 반응 강도, 반응 유무 등.

- 근원섬유단백질에서 발현되는 Troponin I의 경우 모든 축종에 존재하지만 축종별로 Troponin I의 질량 및 등전점이 달랐으며 함량 또한 달랐다. 그리고 Carbonic anhydrase 3의 경우 소와 돼지에서는 발현되었지만 닭과 오리에서는 발현되지 않았다. 그러므로 Carbonic anhydrase 3를 이용하면 포유류(소, 돼지)와 가금류(닭, 오리)를 판별 할 수 있으며, Troponin I를 통해 4종의 원료육을 판별이 가능 할 것으로 판단됨.

○ 가열 제품

- 4종의 원료육을 단일 및 혼합하여 제조하여 분석에 이용함. 이때 가열 조건은 심부온도 80℃에 도달 할 때까지 가열함.

- 비가열 제품에서는 근원섬유단백질 및 근장단백질의 특이적 단백질을 활용하여 정성분석을 하였지만 가열 제품에서는 근원섬유단백질의 특이적 단백질을 활용하여 정성분석을 하였다. 이유는 80℃까지 가열된 제품에서 근장단백질은 가열변성에 의해 활성을 잃어 단백질의 검출이 되지 않았음.



B: bovine, P: porcine, C: chicken, D: duck.

그림 17. 축종별 가열육의 항원-항체 분석 결과.

- 항원-항체 반응을 이용한 정성분석을 실시한 결과(그림 17), Tropomyosin은 다른 3종의 단백질들 보다 가열변성이 심하게 일어나 마커로서의 활용이 불가능 하였고 나머지 3종의 단백질은 마커로서 활용이 가능하였으므로 이들을 활용하면 정성분석이 가능 한 것으로 판단됨.

- 비가열 제품과 마찬가지로 단백질의 검출 강도가 원료육마다 다름. 이는 축종마다 동일한 단백질이라 하더라도 질량 및 등전점이 다르므로 전기영동 상에서도 다른 전기적이동도를 보이는 결과와 높은 상관관계가 있는 것으로 판단됨.

▶ **원료육 정량 분석 기술 최적화**

- 정성분석 결과에 이용한 항체를 사용하여 정량분석을 실시함. 정량분석은 축종마다 가장 많은 차이를 보이는 Troponin I를 대상으로 실시함.
- 정량분석 결과 단백질의 농도에 따라 특이 단백질의 검출 강도가 다름.
- 항원-항체 반응 결과를 활용하여 이미지분석을 실시 한 결과, 특이 단백질의 반응에 의해 필름 상에 표현되는 밀도가 증가함.
- 그림 18과 같이 이미지상 밀도를 이용하여 표준정량곡선을 작성하여 정량분석이 가능할 것으로 판단됨.

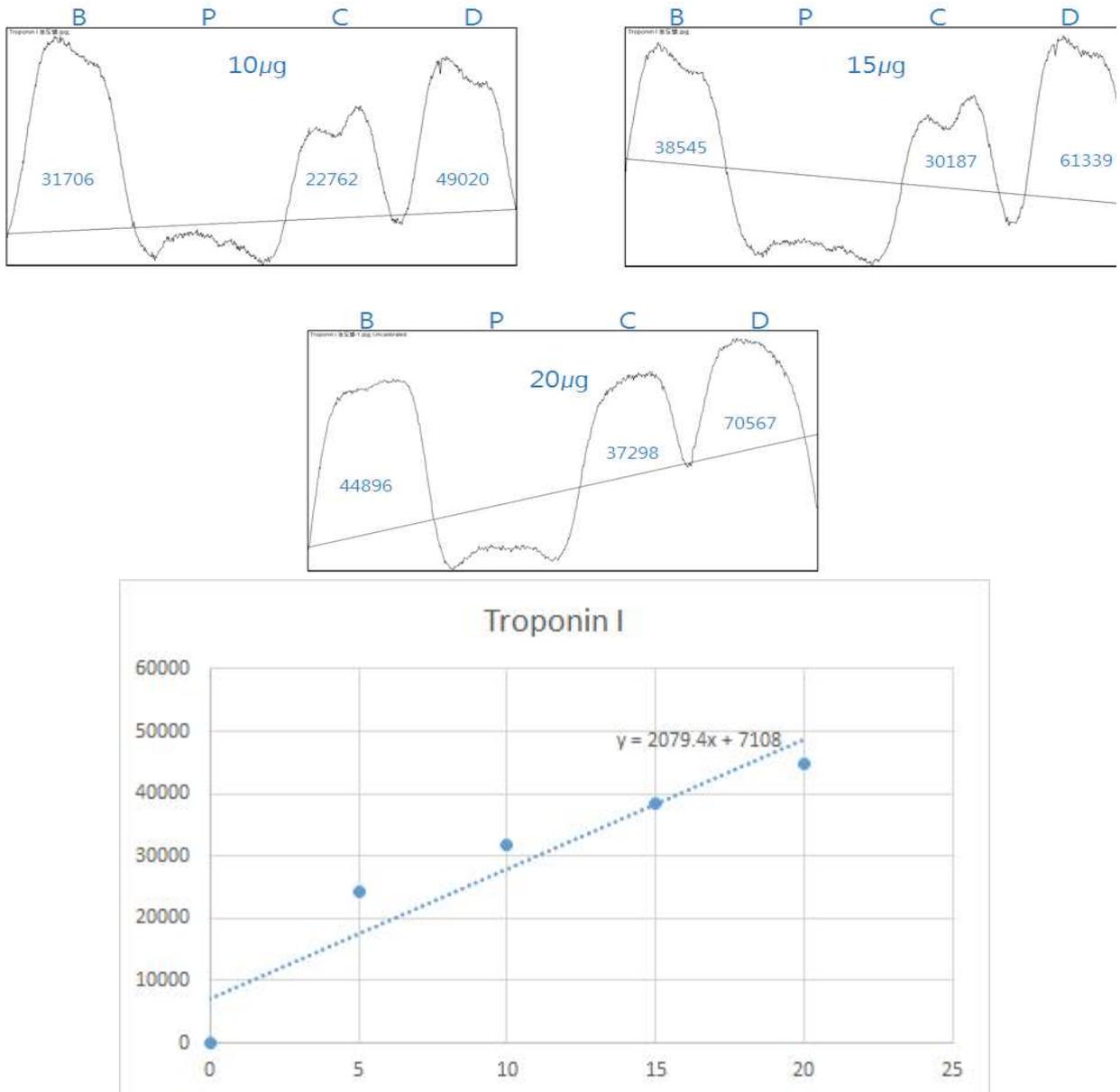


그림 18. 단백질 함량에 따른 Troponin I의 이미지 분석 결과 및 표준정량곡선.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

4-1. 목표달성도

세부연구목표	달성도(%)
- 축종별 full mtDNA 염기서열분석을 통한 유전적 변이 선발	100
- PCR 기법을 이용한 원료육 정성적 판별 시스템 구축	100
- PCR 기법을 이용한 원료육 정성적 판별 시스템 검증	100
- Real-time PCR 기법을 이용한 원료육 정량적 판별 시스템 구축	100
- 축육별 신선육을 이용한 종 특이 단백질 탐색 및 standard spot 설정	100
- 비육단백질의 특이 단백질 탐색	100
- 가열처리한 축육별 원료육의 종 특이 및 변성 단백질 확인	100
- 제품 내에 단백질 분석을 통한 축육 및 비육단백질의 종 특이 단백질의 변성 및 정성 확인	100
- 질량분석을 이용한 축육 및 비육단백질의 정성 확인	100
- 특이 단백질의 정성 및 정량분석을 통한 제품 내 원료성분 식별 기술 개발 및 현장적용 가능성 확인	100

4-2. 관련분야 기여도

○ 본 연구를 통해 개발된 “분쇄 및 혼합육제품 원료육 판별 기술”은 기 연구된 기술보다 앞선 세계적 수준의 우수한 연구 성과로 판단되며, 이를 바탕으로 육제품의 원료육 판별에 적용한다면 육제품 제조 공정을 투명하게 개선할 수 있으며, 부정적 인식이 강한 육제품에 대한 소비자의 인식을 개선 및 육제품 원료에 대한 소비자 신뢰를 향상시킬 수 있는 기회를 제공하고 이를 통해 국내 육가공산업의 성장을 촉진 할 수 있으며, 또한 할랄(Halal) 인증을 위한 검사 기법으로 활용한다면 할랄시장 진출에 본 연구개발결과가 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각됨.

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07		
<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구의 결과는 각종 논문 및 학술발표, 특허출원을 통해 분쇄 및 혼합육제품 원료육 정량, 정성 분석기술에 대한 연구에 기초자료로 활용 ○ 정확하고 신속한 성분 분석 기술 개발을 통해 전문기관 및 국,공립 연구기관에 기술 이전 및 키트 판매 ○ 과제가 완료되는 2016년에 중점으로 개발된 기술을 이용한 특허로 통해 과제 주관기관에 기탁함 ○ 정확한 육제품의 성분 분석을 통해 육제품 시장의 경쟁력을 높일 수 있고 이를 통해 육제품 생산업체의 고급 육제품 생산을 유도 가능 ○ 개발된 분석 기술의 특허 출원을 통한 산업지적재산권확보 가능 ○ 간편하고 정확한 정성, 정량 분석제품 개발로 기술 수출 및 키트 판매를 통한 해외시장 개척 ○ 산업지적재산권확보를 통한 바이오 관련 산업체 등 기술이전 가능 ○ 향후 개발된 기술의 신뢰성을 높이기 위하여 산업현장의 시료를 확보하여 지속적으로 검증 실시 ○ 본 기술에 대한 활용도를 높이기 위해 유관기관과 협조하여 산업현장 활용성 및 공인성 검증 실시 				

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 해당사항		

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10			
구입 기관	연구시설/연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		코드번호	D-11																																										
<p>○ 연구실 안전 관리 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 위험인자 분석 <ul style="list-style-type: none"> · 화학 분야 : 사용 시약의 특성별 위험요소 확인 및 안전표지 부착 · 생물 분야 : 병원균 미생물 및 바이러스 등 인체 유해물질 확인 및 안전표지 부착 · 기타 분야 : 전기, 기계, 환기, 폐기물 등 연구실내 위험, 유해인자 확인 및 개선 - 안전 교육 <ul style="list-style-type: none"> · 자체교육 : 월 1 회 이상 연구실 자체 안전교육 실시(위험물질 취급요령, 보호구 착용 등) · 정기교육 : 반기 1회, 학교주관 연구실안전교육 참석(연구과제 참여자 전원) - 안전점검 <ul style="list-style-type: none"> · 일일점검 : 매일 연구실책임자 및 연구실종사자가 실시 및 기록 · 정기점검 : 연구실안전팀에서 년 2회 측정장비 등을 이용하여 연구실내 불안전사항 점검 실시 · 특별점검 : 연구실 안전사고 발생시 점검을 실시하여 문제점 개선 및 재발방지 계획 수립 - 실험실 정밀안전진단 실시 <ul style="list-style-type: none"> · 대상 : 유해화학물질을 취급하는 연구실, 유해인자를 취급하는 연구실, 독성가스를 취급하는 연구실 · 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고 <p>○ 보험 가입 현황</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>보험명</th> <th>보상내용</th> <th>대상</th> <th>주관부서</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">연구실 안전보험</td> <td>사망/후유장해 : 1억원/인</td> <td rowspan="2">연구활동종사자 (학생, 수료생, 연구원등)</td> <td>안전관리실</td> </tr> <tr> <td>상해 치료비 : 1천만원/인 한도</td> <td>"</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">경영자배상책임보험</td> <td>사망/후유장해 : 2억원/인</td> <td rowspan="3">재학생, (학부생, 대학원생)</td> <td rowspan="3">학생과</td> </tr> <tr> <td>상해 치료비 : 2백만원/인</td> </tr> <tr> <td>대물배상책임: 2백만원/인</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">산업재해보상보험</td> <td>사망/후유장해 : 관련 법률에 정한 기준</td> <td rowspan="2">과제참여자 (재학생 제외)</td> <td rowspan="2">산학협력단</td> </tr> <tr> <td>상해 치료비 : 무한</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">공무원연금보험</td> <td>사망/후유장해 : 관련 법률에 정한 기준</td> <td rowspan="2">공무원 (교수, 직원)</td> <td rowspan="2">교무과, 총무과</td> </tr> <tr> <td>상해 치료비 : 무한</td> </tr> </tbody> </table> <p>○ 추가 이행 계획</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>- 실험종사자 건강검진 실시</td> <td>유해물질 노출 여부 검사 특수 건강검진 실시</td> </tr> <tr> <td>- 실험실 공기질 관리, 환기</td> <td>유해물질농도 측정관리, 환기대책수립</td> </tr> <tr> <td>- 실험실 환경개선공사</td> <td>노후 실험실 개선공사 시행</td> </tr> <tr> <td>- 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치</td> <td>특수소화기 설치(금속하재 전용 소화기 등)</td> </tr> <tr> <td>- 유기용매 별도 보관</td> <td>실험실외부 보관창고 보관, 필요시 운반 사용</td> </tr> <tr> <td>- 실험실 환경안전지침 게시</td> <td>실험실 특성에 맞는 안전수칙 게시(장비사용 등)</td> </tr> <tr> <td>- 고압가스 안전관리</td> <td>용기고정장치 설치, 경보기 설치, 노후가스 용기 폐기</td> </tr> <tr> <td>- 안전보호장비 시설 보완</td> <td>응급사위기, 응급세안기, 응급구급함 등</td> </tr> </tbody> </table>				보험명	보상내용	대상	주관부서	연구실 안전보험	사망/후유장해 : 1억원/인	연구활동종사자 (학생, 수료생, 연구원등)	안전관리실	상해 치료비 : 1천만원/인 한도	"	경영자배상책임보험	사망/후유장해 : 2억원/인	재학생, (학부생, 대학원생)	학생과	상해 치료비 : 2백만원/인	대물배상책임: 2백만원/인	산업재해보상보험	사망/후유장해 : 관련 법률에 정한 기준	과제참여자 (재학생 제외)	산학협력단	상해 치료비 : 무한	공무원연금보험	사망/후유장해 : 관련 법률에 정한 기준	공무원 (교수, 직원)	교무과, 총무과	상해 치료비 : 무한	- 실험종사자 건강검진 실시	유해물질 노출 여부 검사 특수 건강검진 실시	- 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립	- 실험실 환경개선공사	노후 실험실 개선공사 시행	- 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	특수소화기 설치(금속하재 전용 소화기 등)	- 유기용매 별도 보관	실험실외부 보관창고 보관, 필요시 운반 사용	- 실험실 환경안전지침 게시	실험실 특성에 맞는 안전수칙 게시(장비사용 등)	- 고압가스 안전관리	용기고정장치 설치, 경보기 설치, 노후가스 용기 폐기	- 안전보호장비 시설 보완	응급사위기, 응급세안기, 응급구급함 등
보험명	보상내용	대상	주관부서																																										
연구실 안전보험	사망/후유장해 : 1억원/인	연구활동종사자 (학생, 수료생, 연구원등)	안전관리실																																										
	상해 치료비 : 1천만원/인 한도		"																																										
경영자배상책임보험	사망/후유장해 : 2억원/인	재학생, (학부생, 대학원생)	학생과																																										
	상해 치료비 : 2백만원/인																																												
	대물배상책임: 2백만원/인																																												
산업재해보상보험	사망/후유장해 : 관련 법률에 정한 기준	과제참여자 (재학생 제외)	산학협력단																																										
	상해 치료비 : 무한																																												
공무원연금보험	사망/후유장해 : 관련 법률에 정한 기준	공무원 (교수, 직원)	교무과, 총무과																																										
	상해 치료비 : 무한																																												
- 실험종사자 건강검진 실시	유해물질 노출 여부 검사 특수 건강검진 실시																																												
- 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립																																												
- 실험실 환경개선공사	노후 실험실 개선공사 시행																																												
- 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	특수소화기 설치(금속하재 전용 소화기 등)																																												
- 유기용매 별도 보관	실험실외부 보관창고 보관, 필요시 운반 사용																																												
- 실험실 환경안전지침 게시	실험실 특성에 맞는 안전수칙 게시(장비사용 등)																																												
- 고압가스 안전관리	용기고정장치 설치, 경보기 설치, 노후가스 용기 폐기																																												
- 안전보호장비 시설 보완	응급사위기, 응급세안기, 응급구급함 등																																												

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기 타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Physicochemical Characteristics of Beef Jerky Cured with Salted-fermented Anchovy and Shrimp	경상대	주저자	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	0.393	2014.1.24	단독	SCI
2	논문	Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology	경상대	주저자	Food Chemistry	4.232	2015.4.4	단독	SCI
3	논문	SLA classIII 영역의 Haplotype 특성과 Linkage disequilibrium(LD) 분석	경상대 학교기업 GAST	주저자	농업생명 과학연구 원	학진 등재지	2014.08.11	단독	비SCI
4	논문	Effect of bovine plasma protein hydrolysates on the quality properties of cooked pork patty	경상대	주저자	농업생명 과학연구	학진 등재지	2016.1.14	단독	비SCI
5	논문	Effects of injection of hydrolysis plasma protein solution on the antioxidant properties in porcine <i>M. Longissimus Lumborum</i>	경상대	주저자	Journal of Animal Science and Technology	학진 등재지	2016.8 계제예정	단독	비SCI

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
6	논문	인산염의 첨가가 우육 심장을 활용하여 제조한 수리미 유사물의 품질특성에 미치는 영향	경상대	주저자	농업생명 과학연구	학진 등재지	2016.08 계제예정	단독	비SCI
7	학술 발표	분쇄 및 혼합육제품의 중 식별 마커 개발에 관한 연구	경상대 학교기업 GAST	주저자	한국 동물자원 과학회	-	2014.06.26	단독	국내
8	학술 발표	Analysis of porcine myosin heavy chain isoforms by liquid chromatography and mass spectrometry	경상대	주저자	Joint Annual Meeting	-	2014.7.21	단독	국제
9	학술 발표	Optimization of Hydrolysis Conditions for Bovine Plasma Protein using Response Surface Methodology	경상대	주저자	Asian-Aust ralasian Journal of Animal Sciences	-	2014.11.13	단독	국제
10	학술 발표	주요 식육동물을 판별하는 방법에 관한 연구	경상대	주저자	한국축산 식품학회	-	2015.5.21	단독	국내
11	학술 발표	육가공 제품의 원료육 정성, 정량 분석을 위한 multiplex와 Real-time PCR 분석법에 관한 연구	경상대 학교기업 GAST	주저자	한국 동물자원 과학회	-	2015.08.25	단독	국내

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
12	학술 발표	프로테오믹스 기법 활용 원료육 판별을 위한 단백질 마커 탐색	경상대	주저자	한국축산 식품학회	-	2016.5.26	단독	국내
13	특허	새우젓갈 염지 육포의 제조방법	경상대	주저자	대한민국	-	2014.4.24	단독	출원
14	특허	육가공제품의 원료육 판별 마커	경상대 학교기업 GAST	주저자	대한민국	-	2016.07.14	단독	출원
15	특허	원료육 판별을 위한 실시간 PCR 키트 및 방법	경상대 학교기업 GAST	주저자	대한민국	-	2016.07.14	단독	출원

11. 기타사항

코드번호	D-13
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최초 계획서의 정량적 성과 목표의 사업화지표 중 지식재산권 특허 출원 성과의 경우 300% 초과 달성하였음. ○ 최초 계획서의 정량적 성과 목표의 연구기반지표 중 인력양성의 목표는 설정되어 있지 않았으나 1년차(학사 3명), 2년차(박사 1명, 석사 1, 학사 3명) 총 8명의 인력을 양성하는 성과를 도출하여 일부 인력은 관련 산업 분야 취업을 통해 본 과제 성과를 산업현장에서 활용할 수 있도록 인적 네트워크를 형성하였음. ○ 향후 과제 종료 후 특허 출원한 3건의 실적을 바탕으로 2건의 유상기술이전을 실시하고, 연구기반지표 중 부족한 부분은 현재 심사 중인 논문과 과제 종료 후 추적조사 기간 내 100% 달성할 수 있음

12. 참고문헌

코드번호	D-14
○ Contreras-Castillo, C. J., Lomiwes, D., Wu, G., Frost, D. and Farouk, M. M. 2016. The effect of electrical stimulation on <i>post mortem</i> myofibrillar protein degradation and small heat shock protein kinetics in bull beef. <i>Meat Science</i> , 113:65-72.	
○ Gallego, M., Mora, L., Aristoy, C., and Toldra, F. 2015. Optimization of a simple and reliable label-free methodology for the relative quantitation of raw pork meat proteins. <i>Food Chemistry</i> , 182:74-80.	
○ Gallego, M., Mora, L., Aristoy, C., and Toldra, F. 2016. The use of label-free mass spectrometry for relative quantification of sarcoplasmic proteins during the processing of dry-cured ham. <i>Food Chemistry</i> , 196:437-444.	
○ Montowska, M., Alexander, M. R., Tucker, G. A., and Barrett, D. A. 2015. Authentication of processed meat products by peptidomic analysis using rapid ambient mass spectrometry. <i>Food Chemistry</i> , 187:297-304.	
○ Montowska, M. and Pospiech, E. 2013. Species-specific expression of various proteins in meat tissue: Proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species. <i>Food Chemistry</i> , 136:1461-1469.	
○ Steffen, P., Kwiatkowski, M., Robertson, W. D., Zarrine-Afsar, A., Detera, D., Richter, V., and Schluter, H. 2016. Protein species as diagnostic markers. <i>Journal of Proteomics</i> , 134:5-18.	
○ 정구용, 이난희, 임태진, 황보식. 1997. SDS-PAGE기법을 이용한 우육, 돈육 및, 계육의 축종 판별에 관한 연구. <i>한국축산식품학회</i> , 39(5):545-552.	
○ 김순미. 1998. 육가공품에 첨가된 비육류 단백질의 분석을 위한 면역측정법. <i>京畿專門大學 論文集</i> , 26:95-105.	

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.