(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0022241
(43) 공개일자 2019년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01) *G01N 33/12* (2006.01)
G01N 33/561 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/68 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0141454
(22) 출원일자 2017년10월27일
심사청구일자 2017년10월27일
(30) 우선권주장
1020170108081 2017년08월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
양한술
경상남도 진주시 문산읍 월아산로1048번길 15, 102동 1203호(진주문산파란채아파트)
서진규
경상남도 창원시 성산구 용지로121번길 22, 5층(중앙동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충정

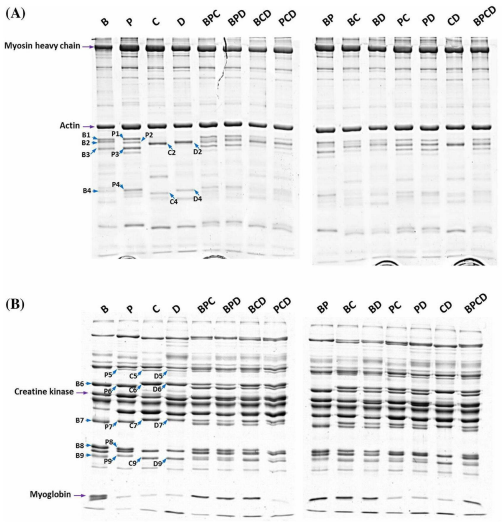
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 마커를 이용한 원료육 종류의 판별 방법**

(57) 요 약

본 발명은 겔 전기 영동 분석에서, 트로포닌 I(TnI), 에놀라제 3, L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수효소 3(CA3) 및 3탄당인산이성질체화효소(TPI)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 마커를 이용하여 포유류와 가금류를 구별하는 단계를 포함하는, 단백질 마커를 이용한 원료육 종류의 판별 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/12 (2013.01)
G01N 33/561 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
G01N 2030/8831 (2013.01)
(72) 발명자
염현웅
경상남도 진주시 진주대로 580, 8동 301호(가좌동, 하이로드빌라)
김갑돈
경상남도 진주시 진주대로 501, 경상대학교(가좌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 MAFRA, 316064-02-2-HD030
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치식품기술개발
연구과제명 가공육에 사용되는 유해 발색제, 보존재 대체소재 개발 및 산업화
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교 산학협력단
연구기간 2016.07.07 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

겔 전기 영동 분석에서, 트로포닌 I(TnI), 에놀라제 3, L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3) 및 3탄당인산이성질체화효소(TPI)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 마커를 이용하여 포유류와 가금류를 구별하는 단계를 포함하는, 단백질 마커를 이용한 원료육 종류의 판별 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 트로포닌 I(TnI)은 근원섬유(myofibrillar) 단백질이고,

상기 에놀라제 3, L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3) 및 3탄당인산이성질체화효소(TPI)는 근형질(sarcoplasmic) 단백질인, 판별 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 트로포닌 I(TnI) 단백질 마커의 LC-MS/MS 스펙트럼으로부터 원료육의 종류를 확인하는 단계를 더 포함하는, 판별 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

트로포미오신 1(TM1) 단백질 마커의 LC-MS/MS 스펙트럼으로부터 계육과 압육을 구별하는 단계를 더 포함하는, 판별 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

트로포닌 I(TnI), 트로포미오신 1(TM1), 트로포미오신 2(TM2), L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3), 글루코스-6-포스페이트 아이소머라아제(GPI)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 마커에 특이적인 항체를 이용한 면역블로팅을 수행함으로써 원료육의 종류를 확인하는 단계를 더 포함하는, 판별 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

항 GPI는 소고기에 대한 마커인, 판별 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 겔 전기 영동 분석은 우육, 돈육, 계육, 압육 및 이의 혼합물을 포함하는 원료육의 근원섬유(myofibrillar) 단백질 또는 근형질(sarcoplasmic) 단백질에 대하여 1차원 겔 전기 영동을 수행하는 것인, 판별 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단백질 마커를 이용한 원료육 종류의 판별 방법에 관련된다.

배 경 기 술

[0002] 소비자가 신뢰할 수 있고 안전한 육류 제품에 대한 요구뿐만 아니라 육류 산업에서의 잘못된 원료 표기 및 대체와 같은 사기 행위로부터의 높은 보호에 대한 요구로 인해, 육류 제품으로부터 육종을 판별하는 방법은 관련 분야 연구자들의 관심사이다. 육종을 확인하는 기술은 일반적으로 단백질 (Montowska & Pospiech, 2012, 2013, Sarah et al., 2016; Scarpeid, Kvaal, & Hildrum, 1998)과 DNA 분자 (Arslan, Irfan-Ilhak, & Calicioglu, Lockely & Bardsley, 2002, Martinez & Yman, 1998, Stamoulis, Stamatis, Sarafidou, & Mamuris, 2010)를 기반으로 한다. 최근에는 MS(Mass spectrometry)와 함께 proteomics 기술(Montowska & Pospiech, 2012; Sarah et al., 2016)이 도입되었지만 저장 및 가공으로 인한 조직 특이적 단백질, 단백 분해 및 변성에 대해서는 논쟁의 여지가 있다. DNA 기반 기술은 단백질 기반 분석에 비해 더 안정적인 방법으로 간주된다. 그러나 이러한 기술은 모두 시간 소모적이며 노동 집약적일 뿐만 아니라 비용도 많이 든다.

[0003] 육류 산업에서 고기 종의 출처를 결정하기 위한, 보다 빠르고 정확하고 저렴한 기술에 대한 요구가 있다. 이를 고려할 때, 최근의 몇몇 연구는 육류 산업에서 잠재적으로 유용한 응용에 영감을 주었다. Stamoulis et al. (2010)은 식품에서 가금류 고기를 식별하는 두 개의 미토콘드리아 DNA 분자를 발견했다. Sakalar와 Abas ı yan ı k (2012)는 SYBR 녹색 형광 물질에 기반한 이중 실시간 PCR을 사용하여 포유류 및 가금류를 신속하게 식별하는 방법을 개발했다. Montowska와 Pospiech (2012, 2013)는 비가열 및 가열된 육류 및 육류 제품에서 육류 판별을 위한 프로테오믹 방식을 도입했다. Sarah et al. (2016)은 LC와 MS를 사용하여 돼지의 특이적 펩타이드를 발견했다. Rapidi, Pavlidis, Mohareb, Panagou, Nychas (2015)는 원료육에서 우육 및 돈육을 탐지하는 새롭고 신속하며 비외과적인 기술로서 다중 분광 영상 분광학을 도입했다. 그럼에도 불구하고, 육류 산업에 쉽게 적용될 수 있는 신속하고 정확하며 간단하고 저렴한 방법을 개발하기 위해서는 육종 제품에서의 육종 확인에 대한 다양한 측면이 여전히 필요하다.

[0004] 이에 따라, 본 발명자들은 육종 판별에 유용한 마커에 대하여 선행 연구를 진행 한 결과, 우육, 돈육, 계육 및 압육 사이의 동일한 단백질에서 상이한 전기영동 이동성을 발견하였다. 이를 활용하여, 본 발명자들은 다른 육종의 골격근에 분포된 동일한 단백질이 전기적 이동도와 아미노산 서열 등에서 상이한 특성을 갖는다는 가설을 세우고, 이를 입증함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Arslan, A., Irfan-Ilhak, O., & Calicioglu, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. Meat Science, 72, 326-330.

(비특허문헌 0002) Lockely, A. K., & Bardsley, R. G. (2002). Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. Meat Science, 61, 163-168.

(비특허문헌 0003) Martinez, I., & Yman, M. I. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. Food Research International, 31, 459-466.

(비특허문헌 0004) Montowska, M., & Pospiech, E. (2012). Myosin light chain isoforms retain their species-specific electrophoretic mobility after processing, which enables differentiation between six species: 2DE analysis of minced meat and meat products made from beef, pork and poultry. Proteomics,

12, 2879-2889.

(비특허문헌 0005) Montowska, M., & 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. Food Chemistry, 136, 1461-1469.

(비특허문헌 0006) Rapodi, A. I., Pavlidis, D. E., Mohareb, F., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2015). Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. Food Research International, 67, 12-18.

(비특허문헌 0007) Sakalar, E., & Abasıyanık, M. F. (2012). The development of duplex real-time PCR based on SYBR Green florescence for rapid identification of ruminant and poultry origins in foodstuff. Food Chemistry, 130, 1050-1054.

(비특허문헌 0008) Sarah, S. A., Faradalila, W. N., Salwani, M. S., Amin, I., Karsani, S. A., & Sazili, A. Q. (2016). LC-QTOF-MS identification of porcine-specific peptide in heat treated pork identified candidate markers for meat species determination. Food Chemistry, 199, 157-164.

(비특허문헌 0009) Scarpeid, H. J., Kvaal, K., & Hildrum, K. I. (1998). Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectrofocusing protein profiles. Electrophoresis, 19, 3103-3109.

(비특허문헌 0010) Stamoulis, P., Stamatis, C., Sarafidou, T., & Mamuris, Z. (2010). Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. Food Control, 21, 1061-1065.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 종래기술에 비해 상대적으로 간단하고, 비용이 저렴하며, 시간이 절약되는 원료육에 대한 육종의 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 구현 예는, 겔 전기 영동 분석에서, 트로포닌 I(TnI), 에놀라제 3, L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3) 및 3탄당인산이성질체화효소(TPI)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 마커를 이용하여 포유류와 가금류를 구별하는 단계를 포함하는, 단백질 마커를 이용한 원료육 종류의 판별 방법을 제공한다.

[0008] 상기 트로포닌 I(TnI)은 근원섬유(myofibrillar) 단백질이고, 상기 에놀라제 3, L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3) 및 3탄당인산이성질체화효소(TPI)는 근형질(sarcoplasmic) 단백질이다.

[0009] 또한, 본 발명의 원료육 종류의 판별 방법은 상기 트로포닌 I(TnI) 단백질 마커의 LC-MS/MS 스펙트럼으로부터 원료육의 종류를 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 원료육 종류의 판별 방법은 트로포미오신 1(TM1) 단백질 마커의 LC-MS/MS 스펙트럼으로부터 계육과 압육을 구별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 원료육 종류의 판별 방법은 트로포닌 I(TnI), 트로포미오신 1(TM1), 트로포미오신 2(TM2), L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3), 글루코스-6-포스페이트 아이소머라아제(GPI)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 마커에 특이적인 항체를 이용한 면역블로팅을 수행함으로써 원료육의 종류를 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0012] 예를 들어, 항 GPI는 소고기에 대한 마커가 될 수 있다.

[0013] 상기 겔 전기 영동 분석은 우육, 돈육, 계육, 압육 및 이의 혼합물을 포함하는 원료육의 근원섬유(myofibrillar) 단백질 또는 근형질(sarcoplasmic) 단백질에 대하여 1차원 겔 전기 영동을 수행하는 것일 수 있

다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 판별 방법에 따르면, 트로포닌 I(TnI), 트로포미오신 1(TM1), 트로포미오신 2(TM2), 에놀라제 3, L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3) 및 3탄당인산이성질체화효소(TPI)의 단백질 마커를 이용함으로써 용이하게 포유류와 가금류를 구별할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 발명자들은 LC-MS/MS 및 면역블로팅 방법을 수행하여 상기 단백질 마커들이 신속하고 간단한 판별 방법의 후보가 될 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 우육(B), 돈육(P), 계육(C) 및 압육(D) 및 이들의 혼합물로부터 분리된 근원섬유(A) 및 근형질(B) 단백질의 일차원 겔 전기영동을 도시한다. 레이블이 있는 파란색 화살표는 각 육종의 관심 밴드를 나타낸다.

도 2는 1차원 겔 전기영동의 이미지 분석 결과를 도시한다. 다른 색깔을 가진 화살표는 각각 근원섬유와 근형질 단백질 내에서 같은 밴드를 나타낸다. 약어 : B, 우육; P, 돈육; C, 계육; D, 압육; TM2, 트로포미오신 2; TnT, 트로포닌 T; TnI, 트로포닌 I; LDH, L-락테이트 디하이드로게나제; CA3, 탄산 탈수 효소 3; GPI, 글루코스-6-포스페이트 아이소머라아제.

도 3은 닭 및 오리 트로포미오신 1(A)의 잔기 169-178에 상응하는 전구 이온 m/z 579.06 (2+) 및 594.19 (2+), 및 소 및 돼지 트로포닌 I (B)의 잔기 72-85에 상응하는 m/z 576.90 (3) 및 567.73 (3+)의 LC-MS/MS 스펙트럼이다.

도 4는 우육(B), 돈육(P), 계육(C), 압육(D) 및 이들의 혼합물의 근원섬유 및 근형질 단백질에 대한 면역 블로팅 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 단백질 마커를 이용한 원료육 종류의 판별 방법은, 겔 전기 영동 분석에서, 트로포닌 I(TnI), 에놀라제 3, L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3) 및 3탄당인산이성질체화효소(TPI)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 마커를 이용하여 포유류와 가금류를 구별하는 단계를 포함한다.

[0018] 본 발명에 따르면, 1차원 겔 전기 영동만으로도 포유류와 가금류를 구별할 수 있으므로, 2D 겔 전기영동 및 LC 분석까지 수행해야 하는 종래 기술에 비해 시간이 절약된다.

[0019] 구체적으로, 상기 겔 전기 영동은 우육(beef), 돈육(pork), 계육(chicken), 압육(duck) 및 이의 혼합물을 포함하는 원료육의 근원섬유(myofibrillar) 단백질 또는 근형질(sarcoplasmic) 단백질에 대하여 수행된다.

[0020] 상기 트로포닌 I(TnI)은 근원섬유(myofibrillar) 단백질이고, 상기 에놀라제 3, L-락테이트 디하이드로게나제(LDH), 탄산 탈수 효소 3(CA3) 및 3탄당인산이성질체화효소(TPI)는 근형질(sarcoplasmic) 단백질이다.

[0021] 이후, 상기 트로포닌 I(TnI) 단백질 마커에 대하여 LC-MS/MS 분석을 수행하여 원료육의 종류를 확인하거나, 트로포미오신 1(TM1) 단백질 마커에 대하여 LC-MS/MS 분석을 수행하여 계육과 압육 구별할 수 있다.

[0022] 뿐만 아니라, 상기 단백질 마커에 특이적인 항체를 이용한 면역블로팅을 수행함으로써 원료육의 종류를 재확인할 수 있다. 구체적으로, 상기 항체는 이에 제한되는 것은 아니나, 항-트로포미오신 2, 항-트로포미오신 1, 항-트로포닌 T, 항-트로포닌 I, 항-글루코스-6-포스페이트 아이소머라아제, 항-L-락테이트 디하이드로게나제, 및 항-탄산 탈수 효소 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 항체는 항 TnI, 항 TM1, 항 TM2, 항 LDH, 항 CA3 및 항 GPI 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상이다.

[0023] **실시예**

[0024] **1. 재료 및 방법**

[0025] *1.1. 샘플 준비*

[0026] 우육과 돈육의 허리 근육(*longissimus* m.) 및 계육과 압육의 흉근의 주요 근육을 상업용 도축장(고기 종류당 10 복제물)에서 구입하고 결합 조직과 눈에 보이는 지방을 다듬은 후에 갈았다. 각각의 고기 유형은 하나씩(우육, B; 돈육, P; 계육, C; 압육, D) 또는 함께(B + P, BP; B + C, BC; B + D, BD; P + C, PC; P + D, PD; C + D,

CD; B + P + C, BPC; B + P + D, BPD; B + C + D, BCD; P + C + D, PCD; B + P + C + D, D, BPCD)를 5분간 혼합기(KP26 M, KitchenAid, St. Joseph, MI, USA)를 사용하여 혼합하였다. 혼합된 샘플은 동일한 양의 각 고기 유형을 사용하여 총 중량이 500g이 되도록 제조되었다. 샘플(4 g)을 모든 혼합물로부터 취하고 30 ml의 엄밀 버퍼(75 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, pH 7.0, 별도)로 균질화하였다. 균질액을 10,000g에서 10분간 원심 분리하고 상등액을 수집하였다. 이 과정을 신선한 추출 버퍼를 사용하여 세 번 반복하고 상등액을 근형질 분획에 사용되었다. 남아있는 펠릿을 30 ㎖의 신선한 추출 버퍼로 균질화시키고 근원섬유에 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford (1976)의 방법에 따라 소 혈청 알부민을 기준으로 결정하였다. 샘플의 최종 농도는 1D 겔 전기영동 분석을 위해 2 mg/ml로 조정되었다.

[0027] *1.1.1. 1D 겔 전기영동 및 이미지 분석*

[0028] 근형질 및 근원섬유 단백질을, 5 % β-메르캅토 에탄올, 4 % SDS, 20 % 글리세롤, 0.2 % 브로모페놀 블루 및 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8)을 함유한 샘플 완충액과 혼합하고(1 : 1, v/v) 100℃에서 3분간 가열하였다. 그 다음, 10 ㎍ 의 단백질을 각 레인에 로딩하고 1D 겔 전기영동을 10 % SDS-폴리아크릴아미드 겔 및 4 % 스태킹 겔을 사용하여 겔 당 20 mA의 정전류로 수행하였다. 겔을 40 % 메탄올 및 7 % 아세트산 중 0.1 % 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250을 사용하여 염색하였다. 1D 겔을 스캐너(2100XL, UMAX®, TX, USA)로 스캔하고 이미지 분석 시스템(Kodak 1D Image Analysis Software, Eastman Kodak Co., NY, USA)을 사용하여 이미지를 분석했다.

[0029] *1.2. 겔 내 분해*

[0030] 겔 이미지 분석 후, 종에 의해 상이한 전기영동 이동도를 나타내는 1D 겔 밴드를 선택하고, 각 밴드를 염색된 겔로부터 절제하였다. 30 % (v/v) 아세토니트릴을 함유하는 50 ㎕ NH_4HCO_3 완충액(50 mM, pH 7.8)으로 밴드를 탈염시키고, 진공 원심분리기(SPD1010, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, 미국)를 이용하여 건조시켰다. 건조된 겔은 4℃에서 2시간 동안 50 mM NH_4HCO_3 (pH 7.8) 내 10 ㎕의 트립신 (Promega, Southampton, UK) 용액(2.5 ng/㎕)을 사용하여 재수화하였다. 재수화된 겔은 12시간 동안 37℃에서 배양하였다. 트립신 펩타이드의 정제는 Choi, Cho, Bae, Zoubaulis, Paik (2003)의 방법을 사용하였다.

[0031] *1.3. LC-MS/MS 및 단백질 확인*

[0032] 모세관 컬럼(150 mm × 0.075 mm, Proxeon, Odense M, Denmark) 및 Magic C18 고정상 수지(5 ㎛, 100Å 기공, Michrom BioResources, CA, USA)를 갖는 나노-LC 및 LTQ 질량 분석기(Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 LC-MS/MS를 수행하였다. (Lee at al., 2014 참조). 이동상 A는 탈이온수 중 0.1 % 포름산이었고, 이동상 B는 아세토니트릴 중 0.1 % 포름산이었다. 크로마토그래피 구배는 1분 동안 5 % B에서 8 % B, 19분 동안 8 % B에서 35 % B, 10분 동안 85 % B 및 10분 동안 5 % B의 선형 증가를 제공하도록 설정되었다. 유속은 300 nl/min으로 유지되었다. 이온 스펙트럼은 300 ~ 1500 m/z의 1회 전체 스캔과 100 ~ 1700 m/z의 3회 제품 이온 스캔의 연속 사이클을 사용하여 데이터 종속 획득 모드에서 수집되었다. 4 Da의 선택 4배 분해능을 사용하여 가장 강한 이온으로 시작하는 전구체 m/z 값을 선택했다. MASCOT 검색 엔진(Matrix Science, London, UK)을 사용하여 NCBInr(Bos taurus, Sus scrofa, Gallus gallus 및 Anas platyrhynchos) 단백질 서열 데이터베이스에 존재하는 MS/MS 스펙트럼을 확인하였다. 데이터베이스 검색 기준은 다음과 같다 : 고정 수정, 아니오; 메티오닌 잔기에서 산화된 가변 변형; 최대 허용 누락 분열, 1; 펩타이드 MS 내성, 100 ppm; 단편 MS 내성, 0.1 Da; 트립신 분해로부터 생성된 펩타이드가 고려되었다. 45 이상의 개별 이온 점수는 유의한 것으로 간주되었다($p < 0.05$).

[0033] *1.4. 면역 블로팅*

[0034] 10% 1D 겔로 분리된 단백질을 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막(Millipore, MA, USA)에 옮기고 5 % 탈지유가 함유된 Tween 20를 함유한 Tris-완충 식염수로 블락킹을 실시하였다. Tropomyosin(TM) 2 (sc-134128), TM1 (sc-32516), troponin(Tn) I (sc-8118), TnT (sc-8123), 글루코스-6-포스페이트 아이소머라아제(GPI) (sc-30392), L-락테이트 디하이드로게나제(LDH) (sc-27232) 및 탄산 탈수 효소(CA) 3(sc-99005)에 대해 특이성을 가진 일련의 7개의 1차 항체 및 2차 항체(항-토끼 IgG-HRP, sc-2357; 항-염소 IgG-HRP, sc-2768)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(TX, USA)에서 구입하였다. 이미다졸 존재하에 디아미노벤지딘을 사용하여 PVDF 막을 가시화하였다.

[0035] **2. 결과**

[0036] *2.0.1. 1D 겔 전기영동 및 이미지 분석*

[0037] 그림 1에서 보는 바와 같이 1D 겔 전기영동으로 각 육종 및 이들의 혼합물로부터 근원섬유 및 근형질 단백질을 분리하였다. 육종 사이에 다른 전기영동 이동성을 보여주는 많은 밴드가 근원섬유 및 근형질 단백질 모두에서 관찰되었다. 근원섬유 단백질(그림 1A)의 경우, 미오신과 액틴은 명확한 밴드로 관찰되었으며 그 강도는 매우 강하게 나타났다. 소(B)와 돼지(P) 근육의 밴드 B1과 P1은 모두 동일한 이동성을 보였다. 그러나 오리(D) 레인에는 밴드가 없고 닭(C) 레인에는 약한 밴드가 관찰되었다. 결과는 1D 겔 이미지 분석 결과에 의해 뒷받침된다(그림 2). 밴드 강도는 B 레인과 P 레인(약 900 픽셀 위치)에서 강했고 D 레인은 피크가 나타나지 않았다. C 레인에서 작은 피크가 관찰되었다. CD를 제외한 모든 혼합물에서 1D 겔(그림 1A)과 이미지 분석 결과(그림 2)에서 명확한 밴드와 피크가 관찰되었다. 밴드 B2, P2, C2 및 D2는 1D 겔 상에서 유사한 이동도를 나타냈다. C2와 D2는 B2와 P2에 비해 더 집중된 밴드였다. CD는 두 종 혼합 샘플(BP, BC, BD, PC, PD 및 CD) 중 가장 강한 강도를 나타내지만 레인 BP의 강도는 가장 약하게 나타났다. 밴드 B3, P3, C3 및 D3에서도 밴드 1 군(B1, P1, C1 및 D1)과 비슷한 경향이 관찰되었다. 닭 샘플을 포함하는 레인 C3 및 CD의 밴드는 강도가 약간 다르게 나타났다. 밴드 4 군(B4, P4, C4 및 D4)의 전기영동 이동도는 육종에 따라 약간 다르게 나타났다. 약한 강도 때문에 1D 겔에서의 존재를 확인하기는 어렵지만, 밴드 4군의 각 피크는 이미지 분석 결과에서 관찰되었다(그림 2). B4와 P4의 피크는 동일한 위치(약 1250 픽셀 위치)에 있고, C4와 D4의 밴드는 동일한 이동 거리(약 1350 픽셀 위치)를 나타냈다. 따라서 BP와 CD를 제외한 모든 혼합 샘플은 밴드 4군에 해당하는 2개의 밴드를 가졌지만 BP와 CD는 합쳐진 밴드가 나타났다(각각 P4를 갖는 B4 및 D4를 갖는 C4).

[0038] 도 1B 및 도 2에 제시된 바와 같이, 근원섬유 단백질과 비교하여 더 많은 명확하고 강한 강도의 밴드가 근형질 단백질에서 관찰되었다. 대략 500 픽셀 위치의 피크는 P(P5), C(C5) 및 D(D5) 레인에서 발견되었지만 B는 500 픽셀 위치에서 밴드를 나타나지 않았다. 따라서 B를 제외한 모든 레인에는 이 픽셀 위치에서 밴드와 피크가 나타났다. 밴드 군 6(B6, P6, C6 및 D6), 7(B7, P7, C7 및 D7) 및 9(B9, P9, C9 및 D9)는 근원섬유 단백질의 밴드 4군과 유사한 이동 패턴을 나타내었다. 각 밴드 군에서 동일한 픽셀 위치가 B와 P, 그리고 C와 D에서 각각 관찰되었다. 그러나 전기영동 이동성의 거리는 밴드 군에 따라 다르다. 밴드 군 6과 7은 C와 D에서보다 B와 P에서 더 먼 거리를 이동하는 반면, B(B4와 B9)와 P(P4와 P9) 밴드는 밴드 군 4와 9에서 C(C4와 C9)와 D(D4와 D9) 밴드보다 빠른 위치에 있다. B8과 P8은 동일한 픽셀 위치(약 1160)에 놓였지만 B 또는 P와 혼합되지 않은 레인 C와 D 또는 CD에서는 밴드는 발견되지 않았다.

[0039] *2.1. LC-MS/MS 및 단백질 확인*

[0040] 밴드 군 1-4에 해당하는 근원섬유 단백질을 LC-MS/MS로 확인하였고 표 1에 나타내었다. 모든 단백질은 118 내지 517의 높은 MASCOT 스코어, 7-51 펩타이드 및 13-69 %의 서열 범위를 갖는 것으로 밝혀졌다. 트로포미오신 2(TM2)로 확인된 밴드 군 1과 트로포미오신 T, 빠른 골격근 유형(TnT)으로 확인된 밴드 군 3은 모두 B와 P에서 명확하게 관찰되었다. 그러나 밴드 군 2와 4는 모든 종에서 발견되었고 이들 밴드는 각각 트로포미오신 1(TM1) 및 트로포닌 I(TnI)로 확인되었다. 동일한 단백질 내에서 각각 B와 P, C와 D 사이의 분자량에는 높은 유사성이 있었지만 포유 동물(B와 P)과 가금류(C와 D) 사이에는 약간의 분자량 차이가 있었다.

Myofibrillar proteins identified by LC-MS/MS after separation by 1D gel electrophoresis.

Band number	Protein name[a]	Accession No.[a]	Species	Theoretical pI/Mw (Da)[b]	Score[c]	Peptides identified	Sequence coverage (%)
B1	Tropomyosin 2 (beta)	Gi|75281699	*Bos taurus*	4.66/32950	517	15	30
B2	Tropomyosin 1 (alpha)	Gi|57281697	*Bos taurus*	4.69/32751	283	16	34
B3	Troponin T, fast skeletal muscle type	Gi|21038994	*Bos taurus*	5.99/32126	224	9	14
B4	Troponin I type 2 (skeletal, fast)	Gi|296471383	*Bos taurus*	8.88/21575	425	23	50
P1	Tropomyosin 2 (beta)	Gi|83778524	*Sus scrofa*	4.62/33403	299	7	13
P2	Tropomyosin 1 (alpha)	Gi|148222268	*Sus scrofa*	4.70/32732	366	26	23
P3	Troponin T, fast skeletal muscle type	Gi|46389781	*Sus scrofa*	6.05/32176	308	13	18
P4	Troponin I, fast	Gi|68349025	*Sus scrofa*	9.02/21505	290	12	36
C2	Tropomyosin 1 (alpha)	Gi|211107	*Gallus gallus*	4.70/32822	118	51	69
C4	Troponin I, fast	Gi|642960	*Gallus gallus*	8.74/20736	443	16	22
D2	Tropomyosin alpha-1 chain, partial	Gi|483500085	*Anas platyrhynchos*	4.60/32852	216	16	39
D4	Troponin I, fast skeletal muscle	Gi|514746936	*Anas platyrhynchos*	9.42/20763	298	15	30

[a] Protein name and accession number were derived 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.

[0041]

Sarcoplasmic proteins identified by LC-MS/MS after separation by 1D gel electrophoresis.

Band number	Protein name[a]	Accession No.[a]	Species	Theoretical pI/Mw (Da)[b]	Score[c]	Peptides identified	Sequence coverage (%)
B6	Enolase 3	Gi|73587037	*Bos taurus*	7.60/47409	831	26	25
B7	L-Lactate dehydrogenase	Gi|126045	*Bos taurus*	8.12/36916	569	19	28
B8	Carbonic anhydrase 3	Gi|74268078	*Bos taurus*	7.71/29637	478	22	60
B9	Triose-phosphate isomerase	Gi|59858493	*Bos taurus*	6.45/26901	441	15	50
P5	Glucose-6-phosphate isomerase	Gi|47523720	*Sus scrofa*	7.79/63257	227	12	18
P6	Enolase 3 (beta)	Gi|85720739	*Sus scrofa*	8.05/47443	620	30	50
P7	L-Lactate dehydrogenase	Gi|473571	*Sus scrofa*	8.18/36880	256	18	35
P8	Carbonic anhydrase 3	Gi|56711366	*Sus scrofa*	6.48/29678	174	7	35
P9	Triose-phosphate isomerase	Gi|262263205	*Sus scrofa*	6.54/26879	452	16	55
C5	Glucose-6-phosphate isomerase	Gi|257524920	*Gallus gallus*	7.40/62405	286	33	49
C6	Enolase 3	Gi|1616990	*Gallus gallus*	6.19/47595	411	22	45
C7	L-Lactate dehydrogenase	Gi|45384208	*Gallus gallus*	8.15/36717	150	8	23
C9	Triose-phosphate isomerase	Gi|136056	*Gallus gallus*	6.71/26848	466	31	50
D5	Glucose-6-phosphate isomerase, partial	Gi|483512607	*Anas platyrhynchos*	6.60/62319	186	19	28
D6	Enolase 3	Gi|1616990	*Gallus gallus*	6.19/47595	253	14	38
D7	L-Lactate dehydrogenase A chain, partial	Gi|483501349	*Anas platyrhynchos*	7.72/37016	220	16	27
D9	Triose-phosphate isomerase	Gi|136056	*Gallus gallus*	6.71/26848	195	21	43

[a] Protein name and accession number were derived 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.

[0042]

[0043] 근형질 단백질 17개가 150-831의 MASCOT 점수, 7-33 확인된 펩타이드 및 18-60 %의 서열 범위(표 2)로 확인되었다. 레인 B에서 발견되지 않은 밴드 군 5는 GPI로 확인되었고, 그룹 6은 모든 종에서 발견되는 에놀라제 3으로 확인되었다. 각각 LDH와 triose-phosphate isomerase(TPI)로 확인된 밴드 군 7과 9는 모든 종에서 발견되었다. B 군(B8)과 P(P8)에서 발견된 밴드 군 8은 CA3으로 확인되었다.

[0044] 동일한 단백질로 확인된 일부 밴드는 1D 겔에서 다른 전기영동 이동도를 나타내었고 이동 패턴은 포유류(B 및 P)와 가금류(C 및 D) 내에서 유사했다. 동일한 단백질의 펩타이드 서열에서 종 특이성 차이를 결정하기 위해 대표적인 LC-MS/MS 스펙트럼을 비교하였으며 그림 3에 나타내었다. TM1의 경우 C의 ^{169}LVIEGDLER^{178} 및 D의 ^{169}LVIIESDLER^{178}에 상응하는 전구 이온의 m/z 579.06 (2+) 및 m/z 594.19 (2+) 스펙트럼은 C의 잔기 174 상의 G(글리신)가 D의 동일한 잔기 상의 S(세린)과 상이함을 나타낸다(도 3A). 전구 이온 m/z 576.90 (3+) 및 m/z 567.73 (3+)의 스펙트럼은 각각 소 TnI의 ^{72}IDAAEEEKYDMEIR^{85} 및 돼지 TnI의 ^{72}IDAAEEEKYDMEIK^{85}에 해당한다. 그러므로 소 TnI의 85번째 잔기의 아미노산 R(아르기닌)은 돼지 TnI의 85번째 잔기의 K(라이신)와 다르다는 것을

확인했다.

[0045] *2.2. 면역 블로팅*

[0046] 7개의 항체를 사용하여 특정 단백질을 검출하였고 그 결과를 도 4에 나타내었다. 항-TM2는 B1 및 P1과 매우 약하게 반응하였으며, 이 단백질은 C 및 D로부터 검출되지 않았다. TM1은 PCD를 제외하고 모든 종 및 이들의 혼합물로부터 검출되었다. 항-TnT는 모든 종과 반응하였지만, PD, CD 및 BPCD 혼합물에 반응된 밴드가 없었다. 항-TnI는 1D 겔상의 모든 샘플로부터 하나 또는 두 개의 밴드를 검출하였다. 약한 반응성은 C와 BC에서만 나타났고 나머지는 항-TnI와 정상 또는 강한 반응성을 보였다. Anti-GPI는 B를 제외한 모든 샘플에서 GPI를 검출했으며 밴드 군 7은 anti-LDH와 반응했다. CA3는 B와 P에서 검출되었으나 1D 겔 결과와 유사하게 C와 D에서는 검출되지 않았다(도 1B).

[0047] **3. 논의**

[0048] 종의 기원에 관계없이 골격근에 많은 단백질이 존재하며 특정 단백질의 양은 종간에 유사하다. 따라서 1D 및 2D 겔 전기영동, 액체 크로마토그래피, 질량 분광법, 실시간 PCR 및 다중 분광 영상 분광법과 같은 다양한 분석 방법으로 접근하여 단백질 수준뿐만 아니라 DNA 분자에서 육종 제품으로부터 종 특이적인 마커를 발견했다(Montowska & Pospiech, 2013; Sarah et al., 2016; Stamoulis et al., 2010). 특히, 1D 겔 전기영동 및 면역 블로팅이 단백질 분석을 위해 일반적으로 사용되는 방법이었다. 단백질의 보다 구체적인 분석을 위해 고도의 기술이 도입되었으나, 그럼에도 불구하고 1D 겔 전기영동의 장점은 상대적인 단순성, 저비용 및 2D 겔 전기영동 및 LC 분석에 비해 시간을 절약할 수 있는 것이다. 예비 실험에서, 소, 돼지, 닭 및 오리 근육으로부터 분리된 단백질 간에 상이한 전기영동 이동성이 관찰되었고, 반복된 이동성 패턴이 관찰되었다. 본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 몇 개의 밴드를 선택하고 확인하였으며, 각 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 재확인하였다.

[0049] Tropomyosin(TM)은 F-액틴 필라멘트의 수축 기능과 관련된 조절 단백질 중 하나이며(Moore, Huxley, DeRosier, 1970), 4개의 TM 유전자에 기반한 TM 단백질의 20 가지 이형이 있다(Pittenger, Kazzaz, & Helfman, 1994). TM1(α-TM)과 TM2(β-TM)는 인간(Billeter, Heizmann, Howald, & Jenny, 1982), 토끼(Smillie, 1979), 고양이(Steinbach, Schubert, & Eldridge, 1980), 참치(Ochiai, Ozawa, Huang, & Watabe, 2010) 그리고 병아리 배아(Montarass, Fiszman, & Gros, 1981)의 골격근에서 발견되는 주요 이형이다. 본 연구에서는 B와 P에서 이 두 가지 TM 이형이 검출되었다. 하지만 D에서는 TM2가 관찰되지 않았고 C에서 매우 약하게 염색된 밴드가 관찰되었다. 이전 연구에서, 속근(fast-twitch) 섬유는 비교적 많은 양의 TM1을 가지고, TM1의 상대적 양은 근육 속도의 증가에 따라 증가한다(Heeley et al., 1995). 본 발명자들은 B, P, C, D에서 골격근 근육 섬유의 상대적 구성을 연구했다 (Hwang, Kim, Jeur, Hur, & Joo, 2010; Kim et al., 2008, 2013). B와 P의 최장근은 속근(fast-twitch) 섬유뿐만 아니라 지근(slow-twitch) 섬유(소의 경우 24.3 %, 돼지의 경우 6.7-14.9 %)로 구성되는 반면, 오리 가슴 근육은 73.3 %의 속근 섬유 및 26.7 % 중급(유형 IIA) 섬유로 이루어져 있으며, 닭의 가슴 근육은 100 % 속근 섬유로 구성되었다. 따라서 TM1은 지근 섬유가 없는 C와 D에서 발견되었고 1D 겔에서 강한 강도를 보였다. 이러한 단백질은 포유류와 가금류의 식별을 위한 마커가 될 수 있다. 또한, 178번째 잔기에 상이한 아미노산을 갖는 독특한 펩타이드를 나타내는 닭 TM1(m/z 579.06, 2+) 및 오리 TM1(m/z 594.19, 2+)의 전구체 이온은 각각 C 및 D를 위한 펩타이드 마커일 수 있다. 이는 Sarah et al.(2016)에 보고된 바와 같으며, Sarah et al.(2016)은 LC-MS/MS에 의해 확인된 돼지 특이적 펩타이드를 사용하여 열처리된 고기에서 돈육을 판별했다.

[0050] 트로포닌(Tn)은 세 가지 다른 하위 단위로 구성된 복합 단백질이다 : TnI는 액틴과 미오신 간의 수축성 상호 작용을 억제하는 역할을 한다; TnT는 트로포미오신에 결합한다; TnC는 Ca^{2+}에 결합하고 이를 조절한다(Ebashi, Kodama, & Ebashi, 2008). 각 하위 단위는 2개 또는 3개의 이소 형태(빠른 골격근, 느린 골격근 및 심장 근육)를 가지고 있다(Ebashi, 1972; Gahlmann, Wada, Gunning, & Kedes, 1988; Greaser & Gergely, 1973, Jin, Zhang, & Bautista, 2008). 본 연구에서, TnT와 TnI는 LC-MS/MS에 의해 동정되었고, 둘은 빠른 골격근 이형이었다. B와 P 겔에서 TnT의 가시 밴드가 관찰되었지만 약한 피크만 나타났다. 따라서, 이 단백질은 육종의 판별에 적합한 마커가 아니다. 반면, TnI는 모든 샘플에서 검출되었지만 포유류(B와 P)와 가금류(C와 D) 간에는 전기영동 이동성이 다르다. 이들 두 그룹은 면역 블로팅의 결과에 따라 구별될 수 있다(그림 4). 다시, 도표 3B에 제시된 바와 같이, LC-MS/MS의 종 특이적 스펙트럼은 육종을 확인하는 유용한 마커이다. TnI의 72-85의 잔기는 종에 따라 다르다. 특히, 소 TnI의 85번째 잔기의 R(아르기닌)은 두 종의 y(n) 이온의 비교에 기초하여, 돼지 TnI의 85번째 잔기의 K(라이신)와 다르다.

[0051] 근형질 단백질의 경우, 에놀라제 3, LDH 및 TPI는 TnI와 동일한 양상을 보였다. 즉, 이들 단백질은 모든 종에서 발견되었지만, 상이한 전기영동 이동성 때문에 가금류(C 및 D)로부터 포유류(B 및 P)를 구별하는 마커가 될 수

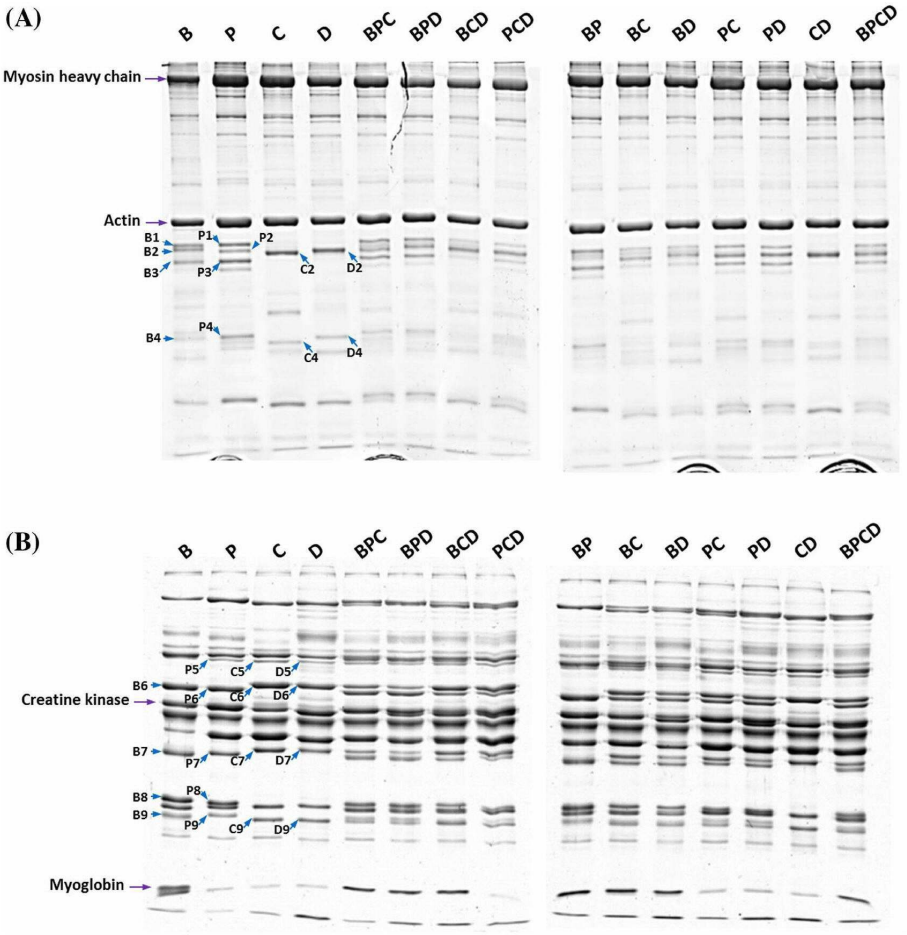
있다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 종 특이적 스펙트럼은 또한 포유류 또는 가금류 내의 각 종에 대한 마커일 수 있다(에놀라제 3, LDH 및 TPI에 대한 LC-MS/MS 스펙트럼은 나타내지 않음). Sarah et al.(2016)은 LC-MS/MS 분석을 사용하여 육류 제품에서 돈육을 확인하기 위한 네 가지 펩타이드를 검출했다. 현재의 연구에서, 1D 겔 전기영동과 면역 블로팅의 결과는 육류 또는 육류 혼합물로부터 포유류 또는 가금류를 구별하는 것을 지원하고, 추가적인 확인이 필요한 경우, LC-MS/MS와 같은 추가 분석을 통해 각 종의 기원을 확인할 수 있다. GPI는 당분해 및 당생성 경로에 연결된 효소이다(Harrison, 1974). 1D 겔의 B 레인에서 GPI를 확인하는 것은 어려웠으나 이 단백질은 항 GPI를 사용하여 검출되었다. 다른 종의 것보다 상대적으로 큰 B 피크를 볼 수 있으므로, B의 GPI는 상위 밴드(그림 2의 * 표시된 피크)와 분리되지 않은 것으로 보인다. 따라서 GPI는 신선한 고기나 그 혼합물에서 B에 대한 마커가 될 수 있다. CAs는 이산화탄소를 중탄산염 및 양성자로 수화되는 것을 촉매하는 아연 함유 효소이다. 이 효소는 포유류에서 발견되며 다음과 같은 4가지 하위 그룹으로 나눌 수 있다. 세포액의(CA1, CA2, CA3, CA7 및 CA13); 미토콘드리아의(CA5A 및 CA5B); 분비된(CA6); 막-관련된(CA8, CA10 및 CA11) (Fleming et al., 1995; Hilvo et al., 2005; Lehtonen et al., 2004; Leinonen, Parkkila, Kaunisto, Koivunen, & Rajaniemi, 2001; Parkkila et al., 2001; Shah et al., 2000). B와 P 모두에서 관찰되는 세포액의 CA3는 I 형 섬유(적색근 유형)에 국한된 효소로 알려져있다(Shima, Tashiro, Hibi, & Hirai, 1983). Anti-CA3는 신선한 고기와 그 혼합물 모두에서 소 및 돼지 CA3 효소를 명확하게 검출했다. 전술한 바와 같이, 유형 I(지근) 섬유는 소 및 돼지 골격근에 분포하지만, 닭 및 오리 가슴(대흉근) 근육에는 유형 I 섬유가 없다. 따라서 CA3는 신선한 고기에서 가금류로부터 포유류를 판별하는 마커가 될 수 있다.

[0052] **4. 결론**

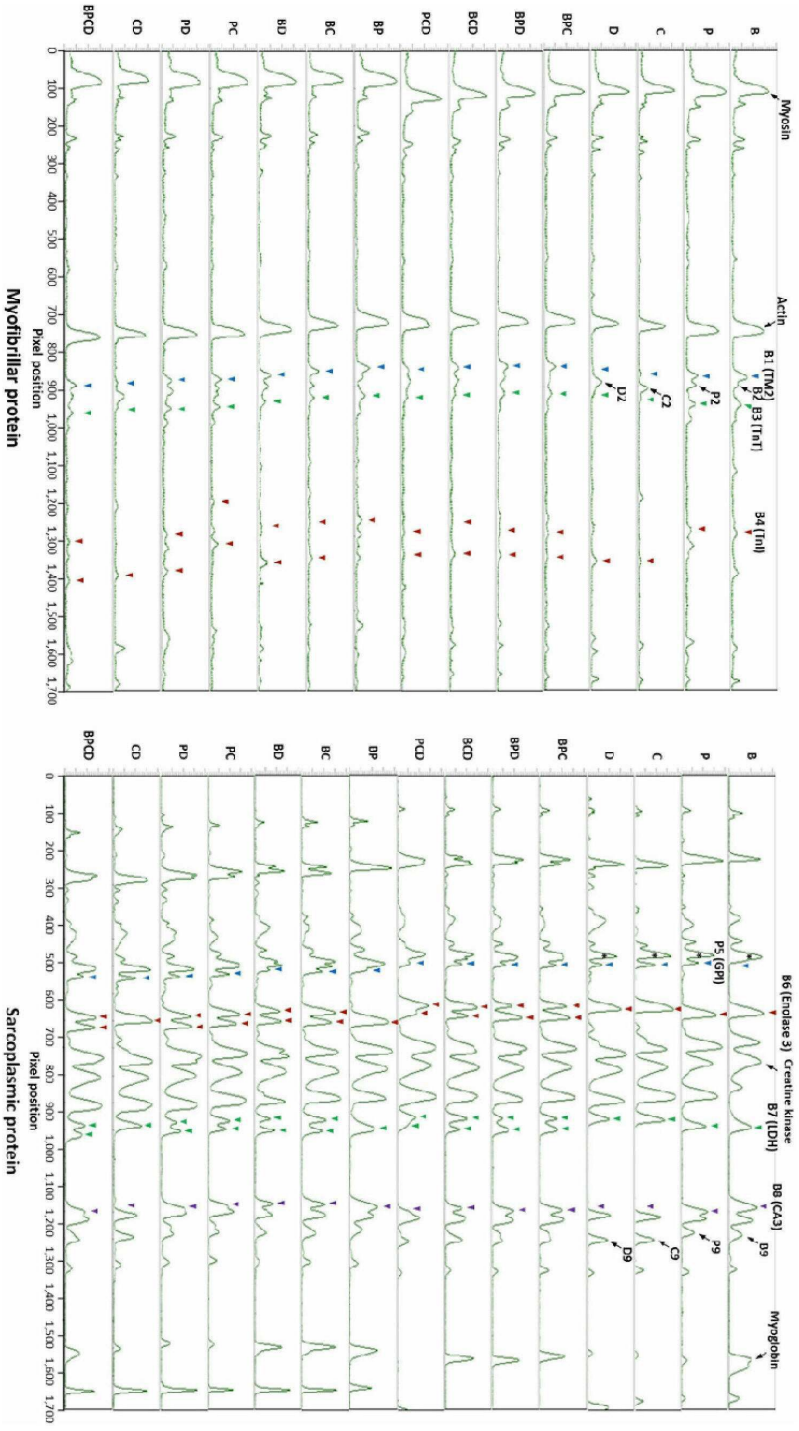
[0053] 근육 섬유 유형 관련 단백질 중 하나인 TM1은 모든 종에서 공통적으로 분포하는 단백질로 관찰되었다. 그러나, LC-MS/MS 스펙트럼은 신선한 육류 및 육류 혼합물로부터 각각의 종을 식별할 수 있게 한다. I형(지근) 섬유에 분포하는 다른 단백질 CA3는 소와 돼지의 최장근(*longissimus* muscles)에서 관찰되며, 이는 I형 섬유를 포함한다. TnI, 에놀라제 3, LDH 및 TPI로 확인된 단백질은 모든 샘플에서 발견되었으며 가금류로부터 포유류를 판별하는 마커가 될 수 있다. 또한, 이들 단백질의 종 특이적 스펙트럼은 LC-MS/MS에 의한 추가 분석 후 각 종의 식별을 위한 펩타이드 마커일 수 있다. 따라서 전기영동 이동성을 비교하고 면역 블로팅 및 LC-MS/MS 분석을 통해 신선한 육류 및 그 혼합물로부터 육종을 식별할 수 있으며, 본 발명자들은 모든 종에서 공통적으로 분포하는 단백질이 육류 판별의 후보가 될 수 있음을 확인했다.

도면

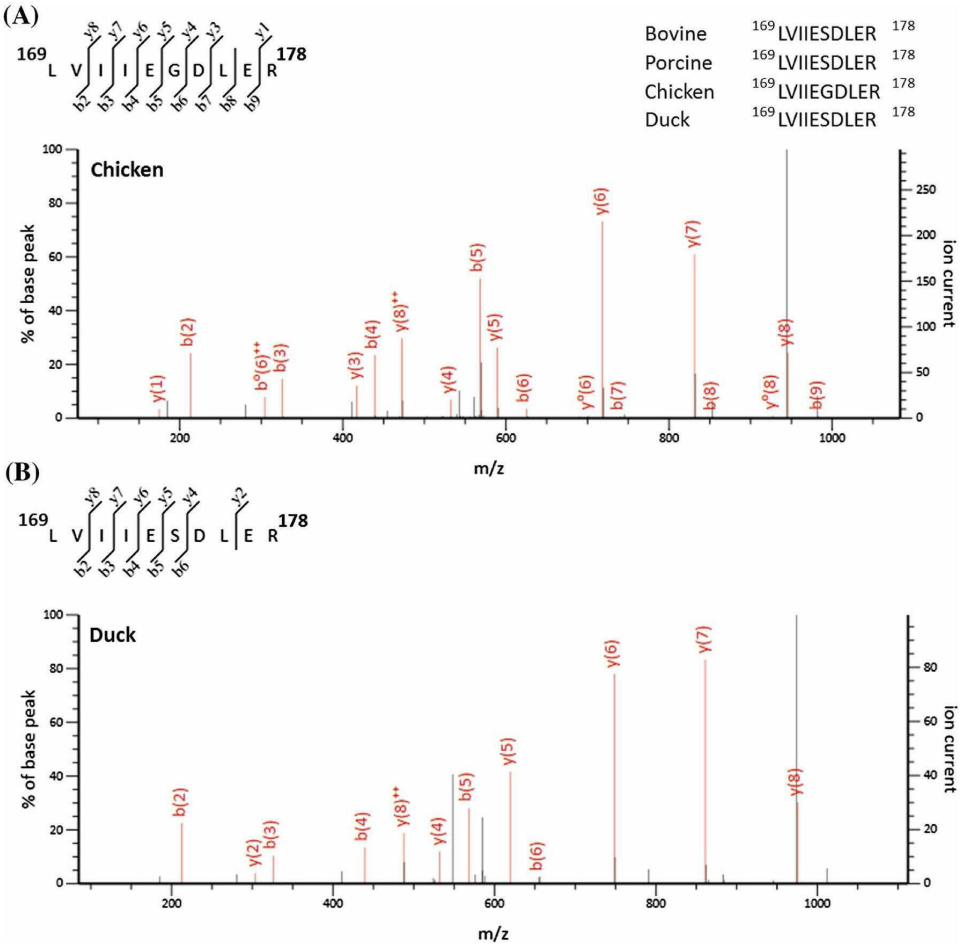
도면1


(A)
B
P
C
D
BPC
BPD
BCD
PCD
BP
BC
BD
PC
PD
CD
BPCD
Myosin heavy chain
Actin
B1
B2
B3
B4
P1
P2
P3
P4
C2
C4
D2
D4
(B)
Creatine kinase
B6
B7
B8
B9
P5
P6
P7
P8
P9
C5
C6
C7
C9
D5
D6
D7
D9
Myoglobin

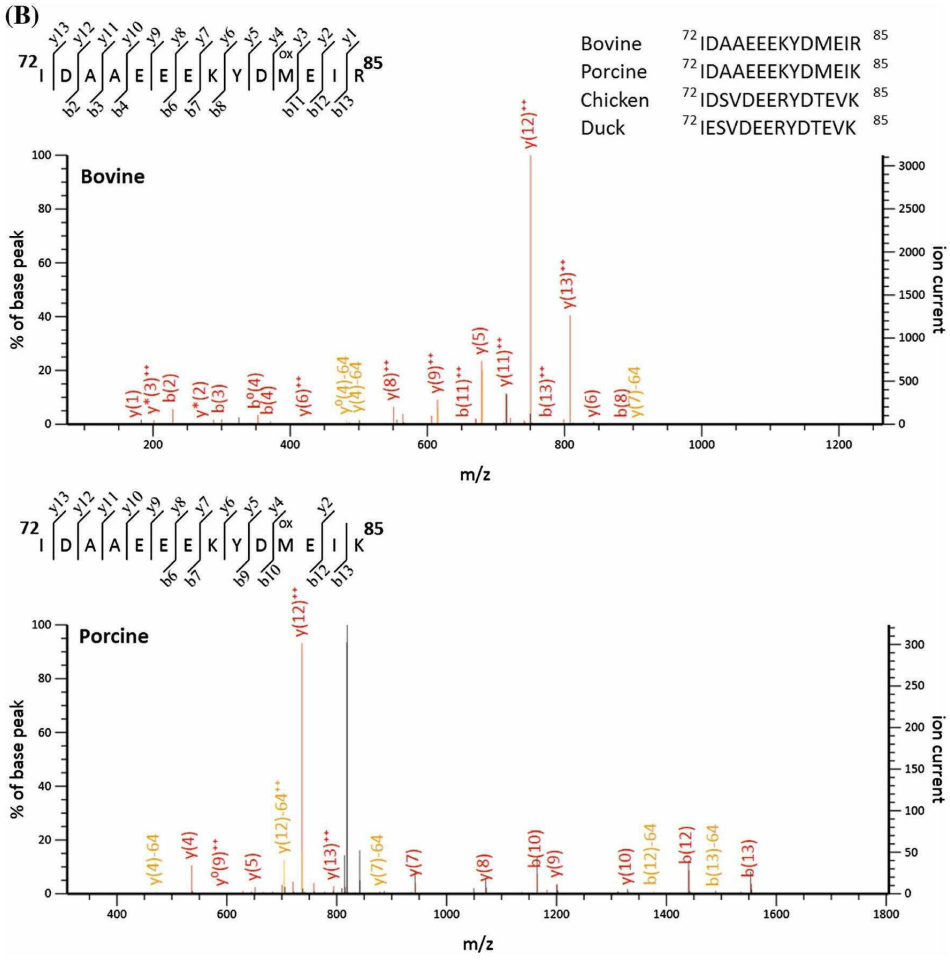
도면2


Myosin
Actin
B1 (TM2)
B2
B3 (TnT)
B4 (TnI)
P2
C2
D2
B6 (Enolase 3)
Creatine kinase
B7 (LDH)
B8 (CA3)
P5 (GPI)
P9
C9
D9
Myoglobin
Pixel position
Myofibrillar protein
Sarcoplasmic protein

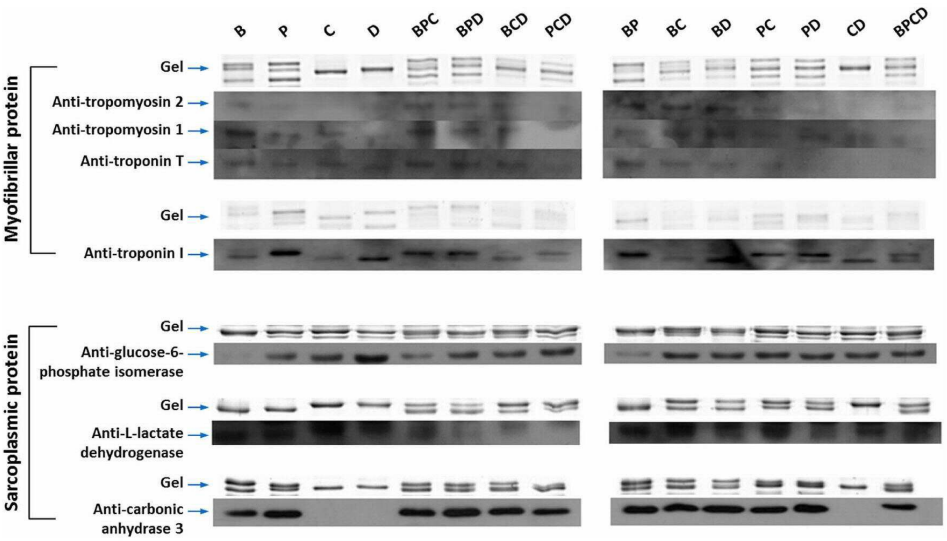
도면3a


(A)
169 L V I I E G D L E R 178
Bovine 169 LVIIESDLER 178
Porcine 169 LVIIESDLER 178
Chicken 169 LVIIEGDLER 178
Duck 169 LVIIESDLER 178
Chicken
% of base peak
ion current
m/z
(B)
169 L V I I E S D L E R 178
Duck
% of base peak
ion current
m/z

도면3b


(B)
Bovine 72IDAAEEEKYDMEIR 85
Porcine 72IDAAEEEKYDMEIK 85
Chicken 72IDSVDEERYDTEVK 85
Duck 72IESVDEERYDTEVK 85
Bovine
Porcine
% of base peak
ion current
m/z

도면4


B
P
C
D
BPC
BPD
BCD
PCD
BP
BC
BD
PC
PD
CD
BPCD
Myofibrillar protein
Gel
Anti-tropomyosin 2
Anti-tropomyosin 1
Anti-troponin T
Anti-troponin I
Sarcoplasmic protein
Anti-glucose-6-phosphate isomerase
Anti-L-lactate dehydrogenase
Anti-carbonic anhydrase 3