

## 식품에서 땅콩 성분의 신속검출을 위한 PCR 방법

이수진 · 윤장호 · 홍광원\*

동국대학교 식품공학과

## A PCR Method for Rapid Detection of Peanut Ingredients in Food

Su Jin Lee, Jang Ho Yoon, and Kwang Won Hong\*

Department of Food Science and Technology, Dongguk University

**Abstract** Peanut (*Arachis hypogaea*) often causes severe allergic reactions in sensitive people. Agglutinin is known to be one of the allergenic proteins in peanut. A polymerase chain reaction (PCR) method was developed to detect peanut ingredients in food using a primer pair corresponding to the agglutinin gene. This primer pair enabled PCR amplification of specific regions of agglutinin DNA from peanut, but not from 11 other nuts, beans, and cereals (pistachio, almond, sunflower seed, pine nut, walnut, soybean, black bean, kidney bean, azuki bean, rice, and black rice). The proposed PCR method successfully identified all of the 6 processed foods containing peanut whereas 13 other processed foods, which don't declare peanuts as an ingredient, were all negative. The detection limit of this method for purified peanut DNA was 100 pg/reaction. The sensitivity of this method was sufficient to detect peanut DNA in soybean DNA mixture which had been spiked with 0.1% peanut DNA.

**Key words:** agglutinin, food allergy, PCR, peanut, rapid detection

### 서 론

최근 모유를 대신한 우유 수유의 증가, 환경오염과 더불어 인스턴트식품, 화학첨가제 식품 등으로 인한 식습관의 변화로 food allergy 질환이 점차 늘어가고 있으며, 현재는 중요한 국민 건강 문제로 대두되고 있다(1-4). 일반적으로 성인의 3-5% 정도가 food allergy를 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 그 빈도는 나이가 어릴수록 높아져서 영유아에게는 6-8%까지 보고되어 있다(5). 국가마다 고유의 식문화가 있어 차이를 보이고는 있지만 계란, 우유, 밀과 땅콩이 일반적인 food allergen으로 알려져 있다(3,6).

그 중 땅콩에 의한 allergy는 외국의 경우엔 매우 흔하고 그 증상이 심한 것으로 보고되어 있으며(7), 영국 국민의 0.5-1.3%가 peanut allergy를 가지고 있고, 그 중 0.1-0.2%는 심각한 증상을 보인다고 한다(8). 그러나 최근 들어 국내에서도 땅콩이 값싸고 질 좋은 단백질의 공급원으로 많은 식품에 흔히 첨가되고 있고, 식품의 기호가 다양해지고 서구화되면서 땅콩의 섭취가 증가하며 땅콩 allergy의 빈도도 증가하는 것으로 보고되고 있다(5). 특히 땅콩 allergy는 몇 가지 이유에 의해 중요한 문제로 여겨지고 있다. 먼저 땅콩에 예민한 사람은 땅콩단백질 100 µg 정도의 매우 적은 양을 섭취하더라도 심각한 allergy 반응을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있으며, 땅콩에 대한 allergy는 성인기까지 유지되

어 일생동안 지속되는 경향이 있고, 도처에 땅콩 함유식품이 존재하기 때문에 피하기가 어렵다(2,8). 또한, 땅콩은 생명을 위협하고 사망에까지 이르게 하는 치명적인 증상인 anaphylaxis를 유발하는 가장 흔한 음식물 중의 하나로 보고된 바 있다(7).

땅콩에 대한 allergy 인구가 증가하고 anaphylaxis에 의한 사망이 매년 증가하고 있음에도 불구하고, 현재에도 땅콩 allergy 소비자들이 allergy 반응으로부터 보호되기 위한 방법은 땅콩이 함유된 식품을 철저히 피하는 것이 절대적이다(5,8,9). 그러나, 땅콩 함유식품을 피하는 것은 식품제조 시 장비나 가공 중의 교차오염 또는 미표시로 인한 hidden allergy의 존재를 정확히 알 수가 없기 때문에 allergy 환자들에게는 어려운 일이며, 이로 인해 땅콩 allergy는 땅콩에 민감한 소비자의 우연한 섭취로 인해 발생하는 것이 대부분이다(4,8). 따라서 소비자를 보호하기 위해서는 다양한 식품에서 hidden allergen의 존재를 특이하게 검출할 수 있는 검출법의 개발이 필요하다. 일반적으로 allergen을 검출하는 방법으로는 주로 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)와 PCR(polymerase chain reaction)이 연구되고 있다. ELISA는 항체를 이용하여 특이적 allergy 유발 단백질을 검출대상으로 하므로 정확하고 사용하기 간편하나 항체 제조과정의 어려움과 식품의 가공이나 제조과정 중 allergy 유발 단백질이 변성되어 검출특이성이나 민감성이 감소할 수 있다. 반면에 특정 DNA를 증폭하여 검출하는 PCR 방법은 target DNA에 대한 특이성과 민감성이 매우 뛰어나고 단시간에 검출이 가능하다는 특징이 있다(10-13). 또한 DNA가 단백질에 비해 식품의 가공이나 제조과정 중 비교적 안정하므로 검출가능성이 높고 계절이나 지역적으로 식품원료에서 단백질함량의 차이로 인한 분석결과의 오차를 줄일 수 있는 장점이 있다(14).

땅콩에서 allergy를 유발하는 주요 항원으로는 vicillin, agglutinin, arachin, glycinin 등이 알려져 있다. 이 중 agglutinin은 세포표면

\*Corresponding author: Kwang Won Hong, Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

Tel: 82-2-2260-3369

Fax: 82-2-2285-3988

E-mail: hkwon@dongguk.edu

Received February 27, 2009; revised May 1, 2009;

accepted May 12, 2009

의 galactose-N-acetyl-galactosamine에 특이하게 결합하는 당단백질로 알려져 있으며(15-18) PCR을 이용한 agglutinin에 대한 검출방법은 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 식품중의 땅콩성분을 검출하는 방법을 개발하기 위하여 agglutinin 유전자를 target DNA로 사용하는 PCR 방법을 확립하고 이를 이용하여 가공식품에서의 땅콩성분 검출과 민감도를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 식품 시료

땅콩을 포함하는 식품으로 땅콩과 땅콩이 대략 5-10% 첨가된 것으로 표시되어 있는 6종의 가공식품(비스킷류 2종, 잼류 1종, 캐러멜류 1종, 다류 1종, 견과류가공품 1종)을 시장에서 구입하여 사용하였다. 또한, 땅콩을 포함하지 않는 식품으로 5종의 견과류(피스타치오, 아몬드, 해바라기씨, 잣, 호두), 2종의 곡류(백미, 흑미), 4종의 두류(대두, 검은콩, 강낭콩, 팥) 및 땅콩이 표시되어 있지 않은 가공식품 13종(비스킷류 10종, 초콜릿가공품 2종, 두유 1종)을 사용하였다.

#### Chromosomal DNA 분리 및 정제

사용한 식품시료의 DNA를 분리·정제하기 위하여 각 시료를 막자사발을 이용하여 분쇄 후 각각 0.1g씩 취하여 PowerPrep™ DNA Extraction kit(Kogenbiotech, Seoul, Korea)를 이용하여 chromosomal DNA를 정제하고 100 µL의 멸균증류수로 DNA를 용출하여 사용하였다. 추출된 DNA는 분광광도계(UV-1201, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 그 농도를 측정하고 -20°C에 보관하며 사용하였다. 땅콩의 경우 0.1g의 시료에서 15 µg의 DNA를 얻었고 그 외에 견과류 5종, 곡류 2종 및 두류 4종에서는 시료 0.1g당 약 8-26.5 µg의 DNA를 얻었다. 또한 가공식품의 경우 땅콩이 첨가된 6종과 땅콩이 첨가되지 않은 13종에서는 시료 0.1g당 대략 5-17.5 µg의 DNA를 얻을 수 있었다. PCR을 하기 위해 1회의 반응에 사용한 DNA의 양은 PCR법의 민감성을 위한 실험을 제외하고는 모두 100 ng의 DNA를 사용하였다.

#### Primer 제작 및 PCR 조건

땅콩에 특이적인 primer를 제작하기 위해 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank에서 땅콩의 agglutinin 유전자(accession No. S42352, U22471, U22468, U22470 및 AJ311170)들의 염기서열을 참고하였다. 이 염기 서열들을 ClustalW를 이용하여 alignment하고 공통의 서열을 참고하여 각각 20mer의 forward primer인 agglutinin-1(5'-CCTTCAACTTCAACTCTTTC-3')과 reverse primer인 agglutinin-2(5'-GAAAGAGAACGAGGTCAC-3')를 제작하였다.

PCR의 조성은 0.2 mL tube에 template DNA 1 pg-1 µg, 각 primer (10 pmol/µL) 2 µL, 5×Taq buffer(with MgCl<sub>2</sub> 10 mM and dNTP 10 mM) 5 µL와 Taq polymerase(1 unit/µL) 1 µL를 넣은 후 최종 반응액이 25 µL가 되도록 멸균 3차 증류수를 추가하였다. 반응은 PCR Express thermocycler(Hybaidd, Waltham, MA, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분간 실시 후, 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초를 1 cycle로 하여 총 35 cycle을 수행하였으며, 마지막 단계로 72°C에서 3분간 수행하였다. PCR product는 ethidium bromide를 포함한 2% agarose gel에서 전기 영동하여 DNA 산물의 크기 및 양을 확인하였다.

#### 특이성 및 민감성 시험

디자인한 primer pair(agglutinin-1/agglutinin-2)의 땅콩에 대한 특이성을 확인하기 위하여 땅콩 및 땅콩이 첨가된 6종의 가공식품과 견과류, 곡류, 두류 및 땅콩이 표시되어 있지 않은 가공식품 13종에서 추출한 각각의 DNA를 대상으로 PCR을 수행하여 특이적 크기의 DNA 단편 생성여부를 확인하였다. 또한 PCR법을 통한 땅콩의 검출 가능한 최소 DNA 농도를 알아보기 위하여 정제한 땅콩의 DNA를 100 ng에서 1 pg까지 단계적으로 10배씩 희석하여 PCR을 수행하였다. 또한 가공식품에 첨가된 땅콩성분의 검출감도를 조사하기 위하여 대두에서 추출한 DNA에 땅콩의 DNA를 10%(땅콩 100 ng+대두 900 ng), 1%(땅콩 10 ng+대두 990 ng), 0.1%(땅콩 1 ng+대두 999 ng), 0.01%(땅콩 100 pg+대두 999.9 ng), 0.001%(땅콩 10 pg+대두 999.99 ng)로 혼합 후 PCR을 수행하였다.

### 결과 및 고찰

#### PCR 검출법의 특이성

땅콩 성분을 검출하는 PCR 방법의 최적조건을 구성하고 그 특이성을 조사하기 위하여 땅콩과 5종의 견과류(피스타치오, 아몬드, 해바라기씨, 잣, 호두), 2종의 곡류(백미, 흑미), 4종의 두류(대두, 검은콩, 강낭콩, 팥)에 대해 PCR을 수행하였다(Fig. 1). 땅콩을 제외한 11종의 다른 식품에서는 어떠한 크기의 DNA 단편도 증폭되지 않아 agglutinin 유전자를 target으로 하는 본 PCR 방법의 특이성을 확인할 수 있었다. 한편 agglutinin 유전자들의 cDNA 염기서열상에서 두 primer에 의해 증폭되는 부위에 intron이 없다면 증폭될 것으로 예상하는 DNA 단편의 크기는 200 bp이다. 실제 땅콩의 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 한 결과 200 bp 정도의 DNA 단편을 얻어 두 primer에 의해 증폭되는 땅콩의 agglutinin 유전자 부위는 intron을 갖고 있지 않은 것으로 보인다.

이 PCR 방법의 특이성을 가공식품에서 확인하기 위하여 땅콩 성분이 대략 5-10% 첨가된 것으로 표시되어 있는 6종의 가공식



Fig. 1. Specificity of the peanut-specific PCR assay. Genomic DNA from various nuts, cereals and beans was amplified with the agglutinin primer pair. Lane M, 100 bp ladder; lane 1, peanut; lane 2, pistachio; lane 3, almond; lane 4, sunflower seeds; lane 5, pine nuts; lane 6, walnut; lane 7, rice; lane 8, black rice; lane 9, soybean; lane 10, black soybean; lane 11, kidney bean; lane 12, red bean; lane 13, no template control.

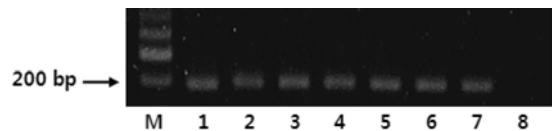
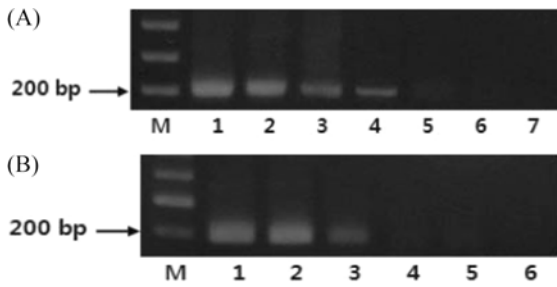


Fig. 2. Detection of peanut-specific DNA from various processed foods containing peanut ingredients. Lane M, 100 bp ladder; lane 1, peanut; lane 2, biscuit 11; lane 3, biscuit 12; lane 4, jam; lane 5, caramel; lane 6, tea; lane 7, nut processed food; lane 8, no template control.



**Fig. 3. Detection limit of the PCR assay (A) and the sensitivity for detection of peanut DNA from the non-specific background DNA (B).** (A) Decreasing amounts of purified peanut DNA (100 ng to 10 pg) was used. Lane M, 100 bp ladder; lane 1, 100 ng; lane 2, 10 ng; lane 3, 1 ng; lane 4, 100 pg; lane 5, 10 pg; lane 6, 1 pg; lane 7, no template control. (B) Small amount of peanut DNA (100 ng to 10 pg) was mixed with excessive amount of soybean DNA to yield the final concentrations ranging from 10% to 0.001%. Lane M, 100 bp ladder; lane 1, 10%; lane 2, 1%; lane 3, 0.1%; lane 4, 0.01%; lane 5, 0.001%; lane 6, no template control.

품(비스킷류 2종, 잼류 1종, 캐러멜류 1종, 다류 1종, 견과류 가공품 1종)을 대상으로 PCR을 수행하였다(Fig. 2). 양성 대조군으로 순수한 땅콩(lane 1)에서 증폭된 200 bp의 DNA 단편과 마찬가지로 테스트한 6종의 땅콩 함유식품 모두 동일한 크기의 DNA 단편만 증폭됨으로서 소량의 땅콩이 포함된 가공식품에 대해서도 본 PCR 방법의 특이성을 확인할 수 있었다. 한편 성분분석표에 땅콩성분의 함유여부가 표시되어 있지 않은 13종의 가공식품(비스킷 10 종, 초콜릿가공품 2종, 두유 1종)에 대해서도 이 PCR 방법을 적용한 결과, 땅콩성분이 표시되어 있지 않은 가공식품 모두 음성반응을 나타내 agglutinin 유전자를 target으로 하는 본 PCR 방법이 땅콩에 특이적임을 확인하였다(data not shown).

#### PCR 검출법의 민감성

일반적으로 식품의 제조과정 중에 알레르기를 일으킬 수 있는 성분이 비의도적 혼입이나 표시의 실수로 인해 hidden allergen이 존재할 가능성을 배제할 수는 없으며 땅콩알레르기를 갖는 사람들은 미량의 땅콩성분에도 민감하게 반응할 수 있으므로 가능한 극소량도 검출할 수 있는 방법이 바람직하다. 현재 국내에서 식품 중 미량의 땅콩성분 검출에 대한 연구 보고는 미흡한 실정이고, 일본의 경우 Hashimoto 등(19)이 밀, 메밀과 땅콩에 대한 multiplex PCR을 수행하여 이 3가지 종을 각각 구분한 연구 결과가 보고되었지만, PCR에 의한 검출한계 실험은 진행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 PCR 방법을 통한 땅콩 DNA의 검출 가능한 최소 농도를 알아보기 위하여 정제된 땅콩의 DNA를 100 ng에서 1 pg까지 단계적으로 10배씩 희석하여 PCR을 수행한 결과 100 pg까지 검출이 가능하였다(Fig. 3A). 땅콩 100 mg에서 약 15 µg의 DNA를 얻을 수 있으므로 이 100 pg의 검출한계는 약 0.67 µg의 땅콩이 존재하는 것을 검출할 수 있다고 볼 수 있다.

일반적으로 땅콩을 그대로 섭취하는 경우를 제외하고는 땅콩의 소비 형태는 가공식품의 원료로 일부만 첨가되어 섭취되는 경우가 대부분이다. 그러므로 가공식품에 원료로 소량 첨가되어 있는 땅콩의 검출한계를 확인하기 위하여 과량의 대두 DNA에 소량의 땅콩 DNA를 인위적으로 혼합 후 땅콩 DNA의 검출을 시도하였다. PCR에 사용하는 template DNA의 총량을 1 µg으로 하여 대두에서 추출한 DNA에 땅콩 DNA를 각각 10%(100 ng)에서 0.001%(10 pg)까지 10배씩 단계적으로 희석하여 섞은 후 PCR을

수행하였다(Fig. 3B). 과량의 대두 DNA와 혼합된 땅콩 DNA의 검출한계는 0.1%(1 ng의 땅콩 DNA+999 ng의 대두 DNA)로 순수한 땅콩 DNA에 대한 검출한계(100 pg)보다 10배 정도 감소하는 것으로 나타났다.

대부분의 가공 식품에서 땅콩의 함량은 비스킷, 스낵 및 사탕 등에 5-10%, 두유에 따라 1% 내외가 함유되어 있는 것을 감안할 때, 땅콩에 대한 특이성과 0.1%의 검출한계를 가진 본 PCR 방법은 땅콩이 첨가된 가공식품에서 땅콩성분을 검출하는 데는 충분히 활용이 가능할 것으로 생각한다. 현재 세계적으로 식품에서 땅콩성분을 검출하기 위한 방법으로 ELISA를 이용한 방법이 주로 사용되고 있다(8,20,21). Holzhauser와 Vieths(8)은 ELISA 방법으로 식품의 종류에 따라 땅콩성분을 2-18 ppm까지 검출이 가능하다고 보고한 바 있다. 이와 비교하여 볼 때 알레르기를 일으키는 agglutinin 단백질의 유전자를 검출하는 본 PCR 시스템은 검출 수준이 비교적 낮아 민감도를 개량할 필요가 있으며 땅콩에서 DNA copy 수가 더 많은 유전자를 target으로 사용하거나 보다 민감한 real-time PCR 방법의 사용이 바람직할 것으로 보인다.

## 요 약

땅콩(*Arachis hypogaea*)은 예민한 사람들에게 심한 알레르기를 일으킬 수 있다. Agglutinin은 땅콩에서 알레르기 유발 단백질의 하나로 알려져 있다. 식품중의 땅콩성분을 검출하기 위하여 agglutinin 유전자에 특이적인 primer pair를 이용하는 polymerase chain reaction(PCR) 방법을 개발하였다. PCR 반응은 땅콩에서 agglutinin DNA의 특정부분을 증폭시켰으나 11종의 다른 견과류, 두류 및 곡류(피스타치오, 아몬드, 해바라기씨, 잣, 호두, 대두, 검은콩, 강낭콩, 팥, 백미, 흑미)에 대해서는 반응하지 않았다. 이 PCR 방법으로 땅콩성분이 함유된 6종의 가공식품을 모두 확인할 수 있었으며 땅콩이 구성성분으로 표시되지 않은 13종의 다른 가공식품에 대해서는 모두 음성반응을 나타냈다. 본 방법은 정제된 땅콩 DNA를 100 pg까지 검출할 수 있었으며 대두 DNA에 땅콩 DNA가 0.1%까지 혼합된 경우도 검출이 가능하였다.

## 감사의 글

본 연구는 동국대학교의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Kim KE, Byung MD, Lee KY. The incidence and principal foods of food allergy in children with asthma. *Pediatr. Allergy Respir. Dis.* 5: 96-106 (1995)
- Sforza S, Scaravelli E, Corradini R, Marchell R. Unconventional method based on circular dichroism to detect peanut DNA in food by means of a PNA probe and a cyanine dye. *Chirality* 17: 515-521 (2005)
- Tanabe S, Miyauchi E, Muneshige A, Mio K, Sato C, Sato M. PCR Method of detecting pork in foods verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1663-1667 (2007)
- Shon DH. Food and allergy. *Food Sci. Indus.* 33: 2-9 (2000)
- King N, Helm R, Stanley S. Allergenic characteristics of a modified peanut allergen. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 963-971 (2005)
- Lee SI. Food allergy. *Safe Food* 1: 12-17 (2006)
- Kim HW, Kim GI, Park CW, Lee CH. A case of anaphylaxis induced by peanut. *Korean J. Dermatol.* 40: 518-521 (2002)
- Holzhauser T, Vieths S. Indirect competitive for determination of

- traces of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein in complex food matrices. *J. Agric. Food Chem.* 47: 603-611 (1999)
9. Ring J, Brockow K, Behrendt H. Adverse reactions to foods. *J. Chromatogr.* 756: 3-10 (2001)
  10. Hirao T, Imai S, Sawada H, Shiomi N, Hachimura S, Kato H. PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) in food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 724-731 (2005)
  11. Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Watanabe T, Matsuda R, Urisu A, Maitani T. Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 55: 1649-1655 (2007)
  12. Holzhauser T, Stephan O, Vieths S. Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: A comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5808-5815 (2002)
  13. Brežná B, Hudecová L, Kuchta T. A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of walnuts in food. *Eur. Food Res. Technol.* 223: 373-377 (2006)
  14. Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21: 1-31 (2004)
  15. Arango ER, Arango R, Adar R. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the cDNA encoding a precursor of peanut agglutinin. *FEBS Lett.* 307: 185-189 (1992)
  16. Chung JY, Moon DC, Kwon KS, Chung TA. The significance of peanut agglutinin in the differentiation between nevocellular nevus and malignant melanoma. *Korean J. Dermatol.* 28: 315-320 (1990)
  17. Dean TP. Immunological responses in peanut allergy. *Clin. Exp. Allergy* 28: 7-9 (1998)
  18. Hourihane JO. Peanut allergy: Recent advances and unresolved issues. *J. R. Soc. Med.* 90: 40-44 (1997)
  19. Hashimoto H, Makabe Y, Hasegawa Y, Sajiki J, Miyamoto F. Detection of allergenic substances in foods by a multiplex PCR method. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 48: 132-138 (2007)
  20. Davis PA, Jenab M, Vanden Heuvel JP, Furlong T, Taylor S. Tree nut and peanut consumption in relation to chronic and metabolic diseases including allergy. *J. Nutr.* 138: 1757-1762 (2008)
  21. Kulis M, Pons L, Burks AW. *In vivo* and T cell cross-reactivity between walnut, cashew and peanut. *Int. Arch. Allergy Imm.* 148: 109-117 (2008)