

< 일 러 두 기 >

- 법령명 : “식품표시기준에 대해서” 별첨 “알레르겐을 함유하는 식품에 관한 표시”
- 최종개정일 : 2026년 4월 1일
- 출처 : 일본 소비자청 (방문일 : 2026년 4월 21일)

별첨 알레르겐을 함유하는 식품에 관한 표시

제1 알레르기 유발물질을 함유하는 식품에 관한 표시 기준

1. 표시의 개요

- (1) 식품 알레르기 증상을 일으킨다는 것이 밝혀진 식품 중 특히 증상 발현수, 중증도를 감안하여 표시할 필요성이 높은 식품(이하 '특정 원재료'라 한다)을 식품표시기준 별표 제14에 제시하였다. 이를 함유하는 가공식품은 식품표시기준에서 정하는 바에 따라 해당 특정 원재료를 함유한다는 내용을 표시해야 한다.
- (2) 특정 원재료에서 유래한 첨가물은 '식품첨가물'이라는 글자 및 해당 특정 원재료에서 유래하였다는 내용을 표시해야 한다.
- (3) 특정 원재료에서 유래한 첨가물을 함유하는 식품은 식품표시기준의 규정에 따라 해당 첨가물을 함유한다는 내용 및 해당 식품에 함유된 첨가물이 해당 특정 원재료에서 유래하였다는 내용을 표시해야 한다.
- (4) 식품표시기준에서 규정하는 알레르기 유발물질을 함유하는 식품에 관한 표시 기준은 소비자에게 직접 판매되지 않는 식품 원재료까지 포함해서 식품유통의 모든 단계에서 표시가 의무화된다.

2. 표시대상

(1) 특정 원재료

식품표시기준에서는 식품 알레르기 증상을 일으킨다는 것이 밝혀진 식품 중 특히 증상 발현수, 중증도를 감안하여 표시의 필요성이 높은 것을 특정 원재료로 규정하고 다음 9개 품목의 표시를 의무화하고 있다.

새우, 캐슈너트, 계, 호두, 밀, 메밀, 알(卵), 유(乳), 땅콩

(2) 특정 원재료에 준하는 것

식품 알레르기 증상을 일으킨다는 것이 밝혀진 식품 중 증상 발현수와 중증자 수가 지속적으로 상당수 발견되지만, 특정 원재료에 비하면 그 수가 적은 것을 특정 원재료에 준하는 것으로 정의한다. 특정 원재료에 준하는 다음 20가지 품목을 원재료로 함유하는 가공식품은 해당 식품을 원재료로 함유한다는 내용을 가능한 한 표시하도록 해야 한다.

아몬드, 전복, 오징어, 연어알(이쿠라), 오렌지, 키위, 소고기, 참깨, 연어, 고등어, 대두, 닭고기, 바나나, 피스타치오, 돼지고기, 마카다미아, 복숭아, 참마, 사과, 젤라틴

(3) 특정 원재료 등의 범위

특정 원재료 및 특정 원재료에 준하는 것(이하, '특정 원재료 등'이라 한다)의 범위는 원칙적으로 별표 1과 같이 일본 표준상품 분류번호로 지정된 범위의 것을 가리킨다.

3. 표시 방법

(1) 특정 원재료 등의 표시 방법

특정 원재료 등의 표시 방법은 다음 중 하나에 따른다.

① 특정 원재료 등을 원재료로 함유하는 경우에는 원칙적으로 원재료명 바로 뒤에 괄호를 넣어서 특정 원재료 등을 함유한다는 내용을 표시한다. 이 경우에 표시 방법은 '(○○ 함유)'('○○'에는 특정 원재료 등의 명칭을 표시하며, 이하 같다)와 같이 표시하는 것으로 하며, 특정 원재료 중 '유(乳)'에 대해서는 '유(乳) 성분을 함유한다'라고 표시한다.

② 특정 원재료 등에서 유래한 첨가물을 함유하는 식품의 경우에는 원칙적으로 해당 첨가물의 물질명과 바로 뒤에 괄호를 넣어서 특정 원재료 등에서 유래한다는 내용을 표시한다. 유래 내용의 표시는 '(○○ 유래)'로 표시하며, 특정 원재료 중 '유(乳)'에 대해서는 '유(乳)성분 유래'가 아닌 '유(乳) 유래'로 표시한다.

단, 식품표시기준 별표 제7의 일괄명에 따라 표시하는 경우에는 일괄명의 바로 뒤에 괄호를 넣어서 특정 원재료 등에서 유래한다는 내용을 표시한다.

또한 식품표시기준 별표 제6의 용도명을 병행표기하는 경우에는 다음과 같이 표시한다.

가. '용도명(물질명: ○○ 유래)' 또는 '용도명(물질명(○○ 유래))'로 표시한다. 가독성을 높이기 위해서는 이중괄호보다 ' : '를 사용하는 것이 좋다.

나. 2개 이상의 특정 원재료 등으로 구성된 첨가물은 '용도명(물질명:○○·○○ 유래)'로 표시한다.

특정 원재료 등에서 유래한 첨가물에 대한 표시의 예는 별표 2와 같다.

(2) 특정 원재료 등의 생략

① 반복되는 알레르기 유발물질의 생략

표시를 하는 최종 식품이 2종류 이상의 원재료 또는 첨가물을 사용하고 있는 경우로 원재료 또는 첨가물에 동일한 특정 원재료 등이 함유되어 있을 경우에는, 그 중 어느 하나에 특정 원재료 등을 함유한다는 내용 또는 유래한다는 내용을 표시하면 그 밖의 원재료 또는 첨가물에 대해서는 특정 원재료 등의 함유 또는 유래에 관한 내용을 생략할 수 있다.

한편 항원성이 인정되지 않는다고는 할 수 없으나 일반적으로 알레르기 유발물질이 함유되어 있더라도 섭취 가능하다고 알려진 식품이 있다. 예를 들면 간장의 원재료로 사용되는 밀은 간장을 제조하는 과정에서 단백질이 분해되기 때문에 항원성이 낮다고 알려져 있으나 현시점에서는 명확한 과학적 지식이 없으므로 특정 원재료 등을 표시해야 한다. 이와 같은 식품에 대해서 향후 정부 차원에서 조사, 연구를 실시하여 과학적 지식을 얻게 되는 경우에는 해당 식품이 원재료로서 함유되는 식품에 대해서는 반복되는 알레르기 유발물질을 생략할 수 없도록 하는 등 식품 알레르기 환자의 선택과 판단에 기여할 수 있도록 재검토할 예정이다.

② 대체표기 등

특정 원재료 등과는 구체적인 표시 방법이 다르지만 특정 원재료 등의 표시와 동일하다고 인정되는 것으로서 별표 3의 표시를 하는 경우에는, 해당 표시로 특정 원재료 등의 표시를 대체할 수 있다(이하, '대체표기'라 한다). 예를 들어 '계란(玉子 또는 たまご)'이라고 표시함으로써 '알(卵) 함유'라는 표시를 생략할 수 있다.

원재료명 또는 첨가물명에 특정 원재료 등 또는 대체표기가 포함된 경우에는 특정 원재료 등을 사용한 식품이라는 것을 알 수 있도록 별표 3의 표시를 하면 특정 원재료 등의 표시를 대체할 수 있다(이하 '확대표기'라 한다). 이 확대표기의 예는 별표 3에 제시하였다.

(3) 기타 표시방법

특정 원재료 등의 표시는 원칙적으로 개별 원재료 또는 첨가물 표시 바로 뒤에 특정 원재료 등의 함유 또는 유래에 관한 내용을 표시해야 하나, 개별표시를 하기 어려운 경우나 개별표시가 부자연스러운 경우에는 일괄표시도 가능하다.

일괄표시를 하는 경우에는 특정 원재료 등 그 자체가 원재료로서 표시되어 있는 경우와 대체표기 등으로 표시되어 있는 경우도 포함해 해당 식품에 함유된 모든 특정 원재료 등을 원재료 기재란의 마지막(원재료와 첨가물을 별도의 기재란으로 구분하는 경우에는 각각 원재료 기재란의 마지막과 첨가물 기재란의 마지막)에 '(일부에 ○○·○○·...함유)'로 표시한다.

또한 개별표시와 일괄표시를 조합하여 사용할 수는 없다.

(4) 표시가 면제되는 경우

① 특정 원재료를 원재료로서 함유하는 식품이라 하더라도 항원성이 인정되지 않는 것은 표시의무가 면제된다. 여기서 말하는 '항원성이 인정되지 않는다'는 것은 알레르기 유발성이 인정되지 않는다는 것으로, 구체적으로는 완전히 정제된 유당 등이 있으며 그 외 식품에 대해서도 앞으로 지식을 축적해 나갈 예정이다.

② 특정 원재료에서 유래하는 첨가물이라 하더라도 알레르기 유발물질성 시험 등에 의하여 항원성이 인정되지 않는다고 판단되는 경우에는 표시의무가 면제된다. 여기서 말하는 알레르기 유발물질성 시험이란, 첨가물의 식품건강영향평가에 적용되는 <첨가물에 관한 식품건강영향평가 지침>(2021년 9월 식품안전위원회 결정)에 근거한 것이다.

③ 특정 원재료에서 유래하는 향료에 관해서는 실제로 식품 알레르기를 일으킨다는 지식이 부족하므로 현시점에서는 특정 원재료를 함유한다는 내용을 표시할 의무가 없다. 그러나 향기 성분 이외에 특정 원재료를 원재료로 하여 제조된 부제(副劑)를 사용하는 경우에는 해당 부제(副劑)에 대해서 표시해야 한다.

- ④ 특정 원재료를 원재료로 하는 알코올류에 대해서는 그 반응이 특정 원재료의 항원성에 의한 것인지 알코올의 작용에 의한 것인지 판단하는 것이 매우 어려우므로 현시점에서는 특정 원재료를 함유한다는 내용의 표시를 의무화하고 있지 않다.

(5) 오염

특정 원재료 등을 원재료로 사용하지 않는 식품을 제조하는 경우라 하더라도 제조 공정상의 문제 등에 의하여 오염이 발생하는 경우가 지적된 바 있다. 이것이 원인이 되어 알레르기 질환자의 건강에 위해가 발생할 것이 우려되므로 다른 제품의 원재료 중 특정 원재료 등이 제조라인에 혼입되지 않도록 해당 제조라인을 충분히 세정하고, 특정 원재료 등을 함유하지 않는 식품부터 순서대로 제조하거나 가능한 한 전용 용기를 사용하는 등 제조자 등은 오염방지를 위한 대책을 철저히 실시해야 한다.

또한 이와 같은 오염방지 대책을 철저히 실시하여도 오염의 가능성을 배제할 수 없는 경우에는 알레르기 질환자에 대한 주의환기 표기를 권장한다.

(6) 기타 유의사항

- ① 식품 알레르기는 극히 미량의 알레르기 유발물질에 의하여 유발되는 경우가 있으므로 특정 원재료를 함유하는 식품의 경우에는 그것을 원재료로 사용하려는 의도와 상관없이 원칙적으로 해당 특정 원재료를 함유한다는 내용을 표시해야 한다.
- ② 특정 원재료 등이 ‘함유되어 있을 수 있다’는 등의 가능성표시는 인정되지 않는다. 일괄표시 이외의 경우에도 동일하다.
- ③ ‘곡류(밀, 대두)’ 또는 ‘밀, 대두’를 단순히 ‘곡류’로 표시하는 등 대분류로 표시하는 것은 인정되지 않는다. 단, 그물로 무분별하게 포획한 것을 그대로 원재료로 사용하기 때문에 어떠한 종류의 어개류(魚介類)가 들어 있는지 파악할 수 없는 제조 공정상의 이유로 ‘단백가수분해물(어개류)’, ‘어장(魚醬)(어개류)’, ‘어장과우더(어개류)’, ‘으깬 어육(어개류)’, ‘어유(魚油)(어개류)’, ‘생선 진액(어개류)’의 6가지에 한하여 예외적으로 인정한다.
- ④ 가공보조제 및 이행(carry-over)과 같이 첨가물 표시가 면제되는 경우에도 특정 원재료는 표시해야 한다. 특정 원재료에 준하는 것도 가능한 한 표시하도록 한다.
- ⑤ 특정 원재료에 준하는 것은 표시의무가 없기 때문에 그것을 표시하지 않는 경우에 알레르기 질환자는 해당 식품이 ‘특정 원재료에 준하는 것을 사용하지 않은 식품’인지 ‘특정 원재료에 준하는 것을 사용하였으나 표시하지 않은 식품’인지 정확하게 판단하기 어렵다. 따라서 알레르기 유발물질을 함유하는 식품의 표시대상이 ‘특정 원재료 9개 품목’인지 ‘특정 원재료에 준하는 20개 품목을 포함하는 29개 품목’인지에 대해서 일괄표시 바깥에 표시하도록 노력해야 한다. 특히 ‘특정 원재료 9개 품목’만이 표시대상인 경우에는

웹사이트 및 전화 등을 통하여 소비자의 문의에 대응하는 등 정보제공을 충실히 해야 한다.

- ⑥ 원재료 표시 중 특정 원재료 등에 관한 표시의 시인성을 높이고 알레르기 질환자가 적절히 판단할 수 있도록 하는 방법으로써 우량오인표시가 되지 않도록 주의하면서 제조자 등이 해당 표시의 문자 색이나 크기 등을 바꾸거나 일괄표시 외에 별도로 강조표시를 하는 등 임의적인 대응을 권장한다.
- ⑦ 용기포장에 담지 않고 판매하는 경우나 외식산업 관련 사업자를 통해 판매되는 식품은 특정 원재료 표시의무가 없으나, 물품 목록이나 메뉴 등을 통해 알레르기 질환자에 대해 정보를 충실히 제공하기 위해 올바른 지식과 이해를 바탕으로 사업자의 규모와 업태 등에 따라 알레르기 유발물질에 관한 정보를 자율적으로 제공하도록 촉구하는 것이 바람직하다.
- ⑧ 특정 원재료 등의 품목에 대해서는 지속적으로 실태조사와 과학적 연구를 실시하고 있으며, 새로운 지식과 보고를 바탕으로 재검토해 나갈 예정이다.

제2 식품관련사업자 등이 유의해야 할 사항

1. 제조기록 등의 보관에 관한 유의사항

- (1) 특정 원재료를 원재료로 함유하는지에 관한 검증은 서면으로 진행하게 되므로 제조기록 등을 적절히 보관해야 한다.
- (2) 특정 원재료는 가공보조제 및 이행(carry-over)에 대해서도 최종제품에 표시해야 하므로 제품에 미량 함유되는 특정 원재료도 확인하여 기록을 보관해야 한다.

2. 알레르기 유발물질에 관한 정보 제공 시의 유의사항

특정 원재료 등뿐만 아니라 특정 원재료 등 이외의 원재료에 대해서도 다음에서 제시하는 예에 따라 전화 문의에 대응하거나 웹 페이지 등을 통해 정보를 제공하는 것이 바람직하다.

- (1) 각 식품에 원재료의 내용을 가능한 한 상세히 표시하고 특정 원재료는 별도로 표시하는 등 다음에서 제시하는 것과 같이 소비자들의 주의를 환기한다.
 - ① 식품명 기재란에는 개별적으로 알기 쉽게 표시하여 판매되고 있는 많은 유사상품 중 구체적으로 어떤 상품에 관한 원재료 표시인지 쉽게 판별할 수 있도록 한다.
 - ② 표시 가능 면적의 제약 등으로 인해 반복되는 알레르기 유발물질의 생략 규정을 적용하는 경우에는 별도의 정보 제공을 통해 모든 특정 원재료의 정보를 정확하게 제공한다.
 - ③ 특정 원재료 등에 대해서는 그것이 미량이라도 함유되었을 가능성이 있는 경우를 포함하여 가능한 한 모든 것을 파악한 후 정보를 제공한다.

④ 웹사이트 등을 통하여 정보를 제공하는 경우에는 각 페이지의 잘 보이는 부분에 표시 내용에 대한 문의에 대응할 수 있는 부서 또는 담당자의 이름, 주소, 전화번호, 전자메일주소 등을 기재한다.

⑤ 기업비밀에 해당하는 경우라 하더라도 특정 원재료를 함유한다는 내용은 표시해야 한다. 그러나 다른 원재료의 상세에 대해서 정보를 제공할 수 없는 경우에는 표시한 것 외에도 원재료를 사용했다는 내용을 기재하고 알레르기에 관한 문의처 등을 기재함으로써 개별적으로 정보를 제공한다.

(2) 그 밖에 소비자 등이 특정 원재료 등 및 제품에 사용된 다른 원재료에 대해서 문의하는 경우 신속하게 회답할 수 있는 체제를 갖추도록 한다.

제3 알레르기 유발물질을 함유하는 식품의 검사에 관한 사항

알레르기 유발물질을 함유하는 식품의 검사방법은 별첨 <알레르겐을 함유하는 식품의 검사 방법>에 따라 실시한다.

아울러 알레르기 유발물질을 함유하는 식품의 검사방법은 검사기술의 진보에 발맞추어 순차적으로 수정할 예정이므로 유의할 필요가 있다.

별표 1

특정 원재료 등의 범위

특정 원재료 등	분류 번호 (1)	분류 번호 (2)	대분류	중분류	소분류
새우	71	3311	새우류	보리새우류	보리새우 (<i>Penaeus japonicus</i>)
	71	3312	"	"	Western king prawn (<i>Penaeus japonicus</i>)
	71	3313	"	"	홍다리얼룩새우 (<i>Penaeus semisulcatus</i>)
	71	3314	"	"	대하(<i>Penaeus chinensis</i>)
	71	3319	"	"	기타 보리새우류
	71	3321	"	중하류	곧은빨중하 (<i>Metapenaeus ensis</i>)
	71	3322	"	"	중하 (<i>Metapenaeus joyneri</i>)
	71	3323	"	"	깔깔새우 (<i>Metapenaeopsis barbata</i>)
	71	3324	"	"	보리새우과의 일종 (<i>Metapenaeopsis acclivis</i>)
	71	3329	"	"	기타 중하류
	71	3331	"	꽃젓새우류	꽃젓새우 (<i>Lucensoergia lucens</i>)
	71	3339	"	"	기타 꽃젓새우류
	71	3341	"	징거미새우류	징거미새우 (<i>Macrobrachium nipponense</i>)
	71	3342	"	"	Lake prawn (<i>Palaemon paucidens</i>)
	71	3349	"	"	기타 징거미새우류
	71	3351	"	소형 새우류	줄무늬도화새우 (<i>Pandalus latirostris</i>)
	71	3352	"	"	딱총새우 (<i>Alpheus brevicristatus</i>)
	71	3353	"	"	북쪽분홍새우 (<i>Pandalus eous</i>)
	71	3359	"	"	기타 소형 새우류
	71	339	"	기타 새우류	
	71	3411	"	닭새우류	닭새우 (<i>Panulirus japonicus</i>)
	71	3412	"	"	펼닭새우 (<i>Linuparus trigonus</i>)
	71	3419	"	"	기타 닭새우류
	71	342	"	부채새우류	
	71	343	"	가재류	
캐슈너트	69	8594	곡과류	기타 곡과류	캐슈너트
게	71	3511	게류	Lithodes turrinus Ortmann(왕게과의 일종, <i>Lithodes turrinus</i> <i>Ortmann</i>)	왕게(<i>Paralithodes</i> <i>camtschaticus</i>)
	71	3512	"	"	가시투성왕게 (<i>Paralithodes brevipes</i>)
	71	3513	"	"	청색왕게 (<i>Paralithodes platypus</i>)
	71	3521	"	<i>Oncinopus aranea</i>	대게 (<i>Chionoecetes opilio</i>)
	71	3522	"	"	일본거미게 (<i>Macrocheira kaempferi</i>)
	71	3531	"	꽃게류	꽃게

특정 원재료 등	분류 번호 (1)	분류 번호 (2)	대분류	중분류	소분류
					(<i>Portunus trituberculatus</i>)
	71	3532	"	"	민꽃게 (<i>Charybdis japonica</i>)
	71	3533	"	"	깨다시꽃게 (<i>Ovalipes punctatus</i>)
	71	3539	"	"	기타 꽃게류
	71	3541	"	밤송이게류	왕밤송이게 (<i>Telmessus acutidens</i>)
	71	3542	"	"	밤송이게 (<i>Telmessus cheiragonus</i>)
	71	359	"	기타 게류	
호두	69	8591	곡과류	기타 곡과류	호두
밀	69	2311	밀	국내산밀	보통밀
	69	2312	"	"	강력밀
	69	2321	"	외국산밀	보통밀
	69	2322	"	"	준강력밀
	69	2323	"	"	강력밀
	69	2324	"	"	듀럼밀
	69	521	밀가루	강력밀가루	
	69	522	"	준강력밀가루	
	69	523	"	박력밀가루	
	69	524	"	보통밀가루	
	69	525	"	세몰리나	
	69	5291	"	기타 밀가루	특수밀가루
	69	5299	"	"	그 외 분류되지 않은 밀가루
메밀	69	532	메밀가루		
알	70	31	식용란	달걀	
	70	32	"	집오리알	
	70	33	"	메추라기알	
	70	39	"	기타 식용란	
	73	3111	달걀 가공제품	액란	전란액
	73	3112	"	"	난백액
	73	3113	"	"	난황액
	73	3121	"	분말달걀	전란분
	73	3122	"	"	난백분
	73	3124	"	"	난황분
	73	313	"	달걀가공 냉동식품	
	73	319	"	기타 달걀가공제품	
	73	391	기타 가공란 제품	집오리알 가공제품	
	73	392	"	메추라기알 가공제품	
	73	399	"	기타 분류되지 않은 가공란 제품	
유(乳) 분류는 식품위생 법의 유(乳) 등령에 준하는 우유 및 치즈를 포함한다.	-	-	유(乳)	생유	
	-	-	"	우유	
	-	-	"	특별우유	
	-	-	"	성분조정우유	
	-	-	"	저지방우유	
	-	-	"	무지방우유	
	-	-	"	가공유	
	-	-	유제품	크림	
	-	-	"	버터	
	-	-	"	버터오일	
	-	-	"	치즈	자연치즈

특정 원재료 등	분류 번호 (1)	분류 번호 (2)	대분류	중분류	소분류
	-	-	"	"	가공치즈
	-	-	"	농축유청	
	-	-	"	아이스크림류	아이스크림
	-	-	"	"	아이스밀크
	-	-	"	"	락토아이스
	-	-	"	농축유	
	-	-	"	탈지농축유	
	-	-	"	무당연유	
	-	-	"	무당탈지연유	
	-	-	"	가당연유	
	-	-	"	가당탈지연유	
	-	-	"	진지분유	
	-	-	"	탈지분유	
	-	-	"	크림분말	
	-	-	"	유청분말	
	-	-	"	단백질농축유청분말	
	-	-	"	버터밀크분말	
	-	-	"	가당분유	
	-	-	"	조제분유	
	-	-	"	조제액상유	
	-	-	"	발효유	
	-	-	"	유산균음료	
	-	-	"	유음료	
	-	-	유(乳) 또는 유제품을 주원료로 하는 식품		
땅콩	69	4811	땅콩	대립땅콩	대립땅콩(꼬투리를 벗기지 않는 것)
	69	4812	"	"	대립땅콩(꼬투리를 벗긴 것)
	69	4821	"	소립땅콩	소립땅콩(꼬투리를 벗기지 않는 것)
	69	4822	"	"	소립땅콩(꼬투리를 벗긴 것)
	69	489	"	기타 땅콩	
아몬드	69	8593	곡과류	기타 곡과류	아몬드
전복	71	271	전복류	전복	
오징어	71	311	오징어류	매오징어류	
	71	312	"	살오징어류	
	71	3131	"	화살꿀뚜기류	화살꿀뚜기 (<i>Loligo bleekeri</i>)
	71	3132	"	"	창꿀뚜기 (<i>Loligo edulis Hoyle</i>)
	71	3133	"	"	흰꿀뚜기 (<i>Sepioteuthis lessoniana</i>)
	71	3139	"	"	기타 화살꿀뚜기류
	71	3141	"	갑오징어류	참갑오징어 (<i>Sepia esculenta</i>)
	71	3142	"	"	쇠갑오징어 (Japanese spineless cuttlefish) (<i>Sepiella japonica</i>)
	71	3143	"	"	입술무늬갑오징어 (<i>Sepia lycidas Gray</i>)
	71	3149	"	"	기타 갑오징어류
	71	3191	"	기타 오징어류	귀오징어

특정 원재료 등	분류 번호 (1)	분류 번호 (2)	대분류	중분류	소분류
					(<i>Euprymna morsei</i>)
	71	3192	"	"	꼬마오징어 (<i>Idiosepius pygmaeus paradoxus</i>)
	71	3193	"	"	갈구리오징어 (<i>Onychoteuthis borealijaponica</i>)
	71	3199	"	"	그 외 분류되지 않은 오징어류
연어알 (いくら)	74	1496	염장 어개류(魚介類)	기타 염장어개류(魚介類)	연어알(스지코)
	74	1497	"	"	연어알(이쿠라)
오렌지	69	8125	감귤류	중만감	네이블오렌지
	69	8126	"	"	발렌시아오렌지
키위	69	866	열대성 및 아열대성 과실(별도 제시한 것은 제외)	키위	
소고기	70	111	소고기	성우고기	
	70	112	"	송아지고기	
	70	113	"	자투리 소고기	
참깨	03	22	유지용 종실, 유지용 견실 및 유지용 종핵	참깨	
연어 연어과속, 연 어속, 연어 속, 연어속 속하는 것으로 육용형은 제외한다.	71	121	회유성연어·송어류	연어 (<i>Oncorhynchus keta</i>)	
	71	122	"	Sockeye salmon (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	
	71	123	"	은연어 (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	
	71	124	"	왕연어 (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	
	71	125	"	산천어 (<i>Oncorhynchus masou</i>)	
	71	126	"	곱사연어 (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	
	71	129	"	기타 회유성연어·송어류	
고등어	71	1441	가다랑어·참치·고등어 류	고등어류	고등어 (<i>Scomber japonicus</i>)
	71	1442	"	"	망치고등어 (<i>Scomber australasicus</i>)
대두	69	4111	대두	국내산 보통 대두	대립 대두
	69	4112	"	"	중립 대두
	69	4113	"	"	소립 대두
	69	4114	"	"	극소립 대두
	69	4119	"	"	기타 국내산 보통 대두
	69	4121	"	외국산 보통 대두	대립 대두
	69	4122	"	"	중립 대두
	69	4123	"	"	소립 대두
	69	4124	"	"	극소립 대두
	69	4129	"	"	기타 외국산 보통 대두
	69	7316	과채류	팥콩	
	69	72351	엽경채류	숙주	콩나물
닭고기	70	1711	가금육	닭고기	성계육
	70	1712	"	"	브로일러
바나나	69	862	열대성 및 아열대성 과실 (별도 제시한 것은 제외)	바나나	

특정 원재료 등	분류 번호 (1)	분류 번호 (2)	대분류	중분류	소분류
피스타 치오	69	8595	곡과류	기타 곡과류	피스타치오 너트
돼지고기	70	121	돼지고기 및 멧돼지고기	돼지고기	
	70	123	"	자투리 돼지고기	
마카다 미아	69	8599	곡과류	기타 곡과류	그 외 분류되지 않은 곡과류
복숭아	69	8311	핵과류	복숭아	사자조생
	69	8312	"	"	창방조생
	69	8313	"	"	오쿠보
	69	8314	"	"	백봉
	69	8315	"	"	백도
	69	8316	"	"	통조림용 복숭아 중
	69	8319	"	"	기타 복숭아
참마 (やまいも)	69	71111	근채류	마(<i>Dioscorea polystachya</i>) (やまのいも)	마(<i>Dioscorea polystachya</i>) (ながいも)
	69	71112	"	"	마(<i>Dioscorea opposita</i>) (やまといも)
	69	71119	"	"	기타 참마
사과	69	82101	인과류(감귤류는 제외)	사과	이와이
	69	82102	"	"	쓰가루
	69	82103	"	"	오린
	69	82104	"	"	골든 딜리셔스
	69	82105	"	"	스타킹 딜리셔스
	69	82106	"	"	딜리셔스
	69	82107	"	"	홍옥
	69	82108	"	"	국광
	69	82111	"	"	조나골드
	69	82112	"	"	후지
	69	82113	"	"	무쓰
	69	82114	"	"	세계일
	69	82199	"	"	기타 사과
젤라틴	-	-			

별표 2

특정 원재료 등에서 유래한 첨가물 표시의 예

1 특정 원재료

특정 원재료의 명칭	구분	첨가물명	특정 원재료의 표시	비고
새우 게	기존 첨가물	키틴	키틴(게 유래)	단, 새우를 원료로 하는 경우는(새우 유래)
		키토산	키토산(게 유래)	
		글루코사민	글루코사민(게 유래)	
캐슈너트	-	-	-	-
호두	-	-	-	-
밀	지정 첨가물	아세틸아디프산이전분	아세틸아디프산이전분(밀 유래)	단, 원재료가 밀인 경우 모두 ‘변성전분(밀 유래)’로 표시할 수 있음
		아세틸산화전분	아세틸산화전분(밀 유래)	
		아세틸인산이전분	아세틸인산이전분(밀 유래)	
		옥테닐호박산나트륨전분	옥테닐호박산나트륨전분(밀 유래) 옥테닐호박산Na전분(밀 유래)	
		초산전분	초산전분(밀 유래)	
		산화전분	산화전분(밀 유래)	
		카복시메틸스타치나트륨	카복시메틸스타치나트륨(밀 유래) 카복시메틸스타치Na(밀 유래)	
		히드록시프로필인산이전분	히드록시프로필인산이전분(밀 유래)	
		히드록시프로필전분	히드록시프로필전분(밀 유래)	
		인산이전분	인산이전분(밀 유래)	
		인산일전분	인산일전분(밀 유래)	
		인산화인산이전분	인산화인산이전분(밀 유래)	
	기존 첨가물	β-아밀라아제	효소(밀 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 ‘일부에 밀 함유’로 표시
		카복시펩티다아제	효소(밀 유래)	
		스핑고지질	스핑고지질(밀 유래)	
	일반음식물 첨가물	글루텐	글루텐(밀 유래)	단, 원재료가 밀인 경우 명칭에 ‘밀’이 들어가므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
		밀추출물	밀추출물	
메밀	기존 첨가물	메밀 전초 재 추출물	식물재추출물	연소된 상태이므로 알레르기 유발물질이 함유되어 있지 않는 것으로 간주됨
		퀘르세틴	퀘르세틴(메밀 유래) 케르세틴(메밀 유래) 루틴분해물(메밀 유래)	단, 원재료가 메밀인 경우 (현재는 화화나무에서 유래한 것만 유통되고 있음)
		효소처리이소케르세틴	효소처리이소케르세틴(메밀 유래) 당전이이소케르세틴(메밀 유래) 효소처리루틴(메밀 유래)	
		효소처리루틴(추출물)	효소처리루틴(추출물)(메밀 유래) 당전이루틴(추출물)(메밀 유래) 효소처리루틴(메밀 유래) 당전이루틴(메밀 유래)	
		루틴(추출물)	루틴(추출물)(메밀 유래)	

특정 원재료의 명칭	구분	첨가물명	특정 원재료의 표시	비고
			메밀전초추출물	명칭에 '메밀'이 들어가므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
			플라보노이드(메밀 유래) 루틴(메밀 유래)	
알(卵)	기존 첨가물	효소처리레시틴	효소처리레시틴(알 유래) 레시틴(알 유래) 유화제(알 유래)	
		효소분해레시틴	효소분해레시틴(알 유래) 레시틴(알 유래) 유화제(알 유래)	
		난각소성칼슘	난각소성칼슘	소성된 상태이므로 알레르기 유발물질이 함유되어 있지 않은 것으로 간주됨
		분별레시틴	분별레시틴(알 유래) 레시틴(알 유래) 레시틴분별물(알 유래) 유화제(알 유래)	
		비소성칼슘(난각비소성칼슘)	난각비소성칼슘 난각Ca 난각칼슘	명칭에 '알(卵)'이 들어가므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
			비소성칼슘(알 유래) 비소성Ca(알 유래)	
		난황레시틴	레시틴(알 유래) 난황레시틴(알 유래) 유화제(알 유래)	
		리소짐	리소짐(알 유래) 난백리소짐(알 유래) 효소(알 유래)	
유(乳) 및 유제품	지정 첨가물	카제이나트륨	카제인Na(유 유래) 카제이나트륨(유 유래)	
	기존 첨가물	유청칼슘	유청칼슘	소성된 상태이므로 알레르기 유발물질이 함유되어 있지 않은 것으로 간주됨
		락토페르옥시다아제	효소(유 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 유(乳) 성분 함유'로 표시
		락토페린농축물	락토페린(유 유래)	
	일반음식물 첨가물	카제인	카제인(유 유래)	
땅콩	-	-	-	-

2 특정 원재료에 준하는 것

특정 원재료에 준하는 것의 명칭	구분	첨가물명	특정 원재료에 준하는 것의 표시	비고
아몬드	-	-	-	-
전복	-	-	-	-
오징어	기존 첨가물	타우린(추출물)	조미료(아미노산:오징어 유래)	명칭에 '오징어'가 들어가므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
	일반음식물 첨가물	오징어먹물색소	오징어먹물색소 오징어먹물	
연어알	-	-	-	-
오렌지	지정 첨가물	메틸헤스페리딘	메틸헤스페리딘(오렌지 유래) 용성비타민P(오렌지 유래) 헤스페리딘(오렌지 유래) 비타민P(오렌지 유래) V.P(오렌지 유래)	단, 오렌지 이외의 감귤에서 유래한 것은 특정 원재료 등의 표시가 필요하지 않음
	기존 첨가물	효소처리헤스페리딘	당전이헤스페리딘(오렌지 유래) 헤스페리딘(오렌지 유래)	단, 오렌지 이외의 감귤에서 유래한 것은 특정 원재료 등의 표시가 필요하지 않음
		헤스페리딘	헤스페리딘(오렌지 유래) 비타민P(오렌지 유래)	
		펙틴	펙틴(오렌지 유래)	
		펙틴분해물	펙틴분해물(오렌지 유래)	
	일반음식물 첨가물	오렌지과즙	오렌지과즙 오렌지주스	명칭에 '오렌지'가 들어가므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
키위	기존 첨가물	악티니딘	효소(키위 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 키위 함유'로 표시
소고기	지정 첨가물	L-아스코빌스테아레이트	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	스테아린산, 팔미트산은 중류, 정제된 상태이므로 알레르기 유발물질이 존재하지 않는 것으로 간주됨
		L-아스코빌팔미테이트	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	
		비타민A지방산에스테르	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	스테아린산, 팔미트산은 중류, 정제된 상태이므로 알레르기 유발물질이 존재하지 않는 것으로 간주됨 비타민A지방산에스테르는 아세트산에스테르 또는 팔미테이트가 주체
		글리세린	대두 향 참조	대두 향 참조
		글리세린지방산에스테르		
		프로필렌글리콜지방산에스테르		
		자당지방산에스테르	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	스테아린산, 팔미트산은 중류, 정제된 상태이므로 알레르기 유발물질이 존재하지 않는 것으로 간주됨

특정 원재료에 준하는 것의 명칭	구분	첨가물명	특정 원재료에 준하는 것의 표시	비고
		스테아릴젖산칼슘	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	스테아린산은 위와 같음 유산은 특정 원재료를 사용하지 않음 칼슘은 수산화칼슘 또는 산화칼슘을 사용
		소르비탄지방산에스테르	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	스테아린산, 팔미트산은 증류, 정제된 상태이므로 알레르기 유발물질이 존재하지 않는 것으로 간주됨
	기존 첨가물	고급지방산	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	증류, 정제된 상태이므로 알레르기 유발물질이 함유되어 있지 않은 것으로 간주됨
		담즙분말	담즙분말(소 유래) 콜산(소 유래) 데옥시콜산(소 유래) 유화제(소 유래)	단, 돼지의 경우에는 (돼지 유래)로 기재 진피층을 포함하지 않는 내장 유래 원재료는 특정 원재료 등의 표시가 필요하지 않음
		헴철	헴철(소 유래)	
		리파아제	효소(소 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 소 함유'로 표시
		유(乳)응고효소	효소(소 유래)	단, 진피층을 포함하지 않는 내장 유래 원재료는 특정 원재료 등의 표시가 필요하지 않음
	일반음식물 첨가물	콜라겐	콜라겐(소 유래)	
참깨	기존 첨가물	참깨유불검화물	참깨유불검화물(참깨 유래) 참깨유추출물(참깨 유래)	
		참깨잎추출물	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	연소된 상태이므로 알레르기 유발물질이 함유되어 있지 않은 것으로 간주됨
		d-α-토코페롤	비타민E 추출비타민E	분자증류한 것은 알레르기 유발물질이 제거되었을 것으로 간주되어 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
		d-γ-토코페롤	d-α-토코페롤과 같음	
		d-δ-토코페롤	d-α-토코페롤과 같음	
		혼합토코페롤	분자증류한 상태의 것 : 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	단, 대두유 등으로 희석한 것은 첨가물 표시에 (대두 유래) 등의 표시가 필요함
연어	기존 첨가물	이리단백	이리단백(연어 유래) 프로타민(연어 유래)	단, 원료가 연어인 경우에 한함
고등어	-	-	-	-
대두	지정 첨가물	글리세린	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	증류, 정제된 상태이므로 알레르기 유발물질이 함유되어 있지 않은 것으로 간주됨
		글리세린지방산에스테르	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음 미증류물 : 글리세린지방산에스테르(대두 유래) 글리세린에스테르(대두 유래) 유화제(대두 유래)	증류물은 알레르기 유발물질이 함유되어 있지 않은 것으로 간주됨
		프로필렌글리콜지방산에스테르	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	반응에 사용하는 '지방산'은 미증류·정제된 상태이므로 알레르기 유발물질이 함유되어 있지 않은 것으로 간주됨
		스테아릴젖산칼슘	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	
		소르비탄지방산에스테르	특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	
	기존 첨가물	β-아밀라아제	효소(대두 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 대두 함유'로 표시

특정 원재료에 준하는 것의 명칭	구분	첨가물명	특정 원재료에 준하는 것의 표시	비고
		고급지방산	소고기 향 참조	소고기 향 참조
		효소처리레시틴	효소처리레시틴(대두 유래) 레시틴(대두 유래) 유화제(대두 유래)	
		효소분해레시틴	레시틴(대두 유래) 유화제(대두 유래)	
		식물성스테롤	식물성스테롤(대두 유래) 스테롤(대두 유래) 유화제(대두 유래)	
		식물레시틴	식물레시틴(대두 유래) 레시틴(대두 유래) 유화제(대두 유래)	
		대두사포닌	사포닌(대두 유래) 대두사포닌	명칭에 '대두'가 있으므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
		d-α-토코페롤	비타민E 추출비타민E	분자증류한 것은 알레르기 유발물질이 제거되었을 것으로 간주되어 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음. 단, 대두유 등으로 희석한 것은 첨가물 표시에 (대두 유래) 등의 표시가 필요함.
		d-γ-토코페롤	d-α-토코페롤과 같음	
		d-δ-토코페롤	d-α-토코페롤과 같음	
		볶은대두추출물	볶은대두추출물	명칭에 '대두'가 있으므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
		퍼옥시다아제	효소(대두 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 대두 함유'로 표시함
		분별레시틴	분별레시틴(대두 유래) 레시틴분별물(대두 유래) 레시틴(대두 유래) 유화제(대두 유래)	
		포스포리파아제	효소(대두 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 대두 함유'로 표시
		혼합토코페롤	분자증류한 상태의 것 : 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음	분자증류한 것은 알레르기 유발물질이 제거되었을 것으로 간주되어 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음. 단, 대두유 등으로 희석한 것은 첨가물 표시에 (대두 유래) 등의 표시가 필요함
		리폭시게나아제	효소(대두 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 대두 함유'로 표시
	일반음식물 첨가물	대두다당류	대두다당류 대두헤미셀룰로스	명칭에 '대두'가 있으므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
닭고기	기존 첨가물	히알루론산	뮤코다당(닭 유래)	
바나나	-	-	-	-

피스타치오	-	-	-	-
돼지고기	지정첨가물	글리세린	소고기 항 참조	소고기 항 참조
		글리세린지방산에스테르		
		프로필렌글리콜지방산에스테르		
	기존첨가물	카탈라아제	효소(돼지 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 돼지고기 함유'로 표시 단, 진피층을 포함하지 않는 내장에서 유래한 것은 특정 원재료 등의 표시가 필요하지 않음
		고급지방산	소고기 항 참조	소고기 항 참조
		판크레아틴	효소(돼지 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 돼지고기 함유'로 표시. 단, 진피층을 포함하지 않는 내장 유래 원재료는 특정 원재료 등의 표시가 필요하지 않음
		헴철	헴철(돼지 유래)	소의 경우에는 (소 유래)로 표시
		포스포리파아제	효소(돼지 유래)	비활성 상태인 경우에는 물질명이 표시되지 않으므로 '일부에 돼지고기 함유'로 표시 단, 진피층을 포함하지 않는 내장 유래 원재료는 특정 원재료 등의 표시가 필요하지 않음
일반음식물첨가물	콜라겐	콜라겐(돼지 유래)		
마카다미아	-	-	-	-
복숭아	-	-	-	-
참마	-	-	-	-
사과	기존첨가물	효소분해사과추출물	사과추출물 사과엑기스	명칭에 '사과'가 있으므로 특정 원재료 등의 표시는 필요하지 않음
		펙틴	펙틴(사과 유래)	단, 원료가 사과인 경우에 한함
		펙틴분해물	펙틴분해물(사과 유래)	

(주)

1. 상기 목록은 대표적인 첨가물 표시의 예를 정리한 것임.
2. 가공보조제, 이행(carry-over)에 해당하는 경우로서 첨가물명을 생략하는 경우에도 특정 원재료 등의 표시는 필요하므로 일괄표시함.
3. 용도명을 병기하는 경우의 특정 원재료 등의 표기는 물질명과 특정 원재료 등의 사이에 ‘:’를 넣는다.
예) 증점제(펙틴:사과 유래)
4. 일괄명을 병기하는 조미료의 경우에도 ()안에 ‘:’을 사용하여 특정 원재료를 표시한다.
예) 조미료(아미노산:오징어 유래)
5. 그 밖의 특정 원재료 등에서 기원하는 첨가물은 상기 목록에 준하여 표기하는 것으로 한다.

별표 3

특정 원재료 등의 대체표기법 목록

1 특정 원재료

특정 원재료 (식품표시기준에 규정된 품목)	대체표기	확대표기(표기의 예)
	표기방법 및 문구는 다르나 특정 원재료와 동일함을 알 수 있는 표기	특정 원재료명 또는 대체표기를 포함하고 있어 그것을 사용한 식품임을 알 수 있는 표기의 예
새우(えび)	새우(海老) 새우(エビ)	새우튀김 꽃젓새우
캐슈너트		
게(かに)	게(蟹) 게	참게 게살쇼마이 왕부채게
호두(くるみ)	호두(クルミ)	호두빵 호두케이크
밀(小麥)	밀(こむぎ) 밀(コムギ)	밀가루 밀배아
메밀(そば)	메밀(ソバ)	메밀떡 메밀가루
알(卵)	달걀(玉子) 달걀(たまご) 달걀(タマゴ) 달걀(エッグ) 달걀(鶏卵) 집오리알 메추라기알	달걀말이 햄에그
유(乳)	밀크(ミルク) 버터 버터오일 치즈 아이스크림	아이스밀크 생유 갈릭버터 우유 가공치즈 농축유 유당 가당연유 유단백 조제분유
땅콩(落花生)	땅콩(ピーナッツ)	땅콩버터 땅콩크림

※ ‘난백’ 및 ‘난황’에는 특정 원재료명(알)이 포함되어 있으나, 사고를 방지하기 위하여 반드시 알(卵)을 포함하고 있다는 내용을 확대표기해야 한다.

2 특정 원재료에 준하는 것

통지에 규정된 품목	대체표기		확대표기(표기의 예)	
	표기방법 및 문구는 다르나 특정 원재료에 준하는 것과 동일함을 알 수 있는 표기		특정 원재료에 준하는 것의 명칭 또는 대체표기를 포함하고 있어 그것을 사용한 식품임을 알 수 있는 표기의 예	
아몬드			아몬드오일	
전복 (あわび)	전복(アワビ)		쥬 전복	
오징어 (いか)	오징어(イカ)		오징어튀김	오징어먹물
이쿠라 (いくら)	이쿠라(イクラ) 스지코(スジコ)	스지코(すじこ)	이쿠라 간장절임	염장 스지코
오렌지			오렌지소스	오렌지주스
키위 (キウイ フルーツ)	키위(キウイ) 키위(キーウィー) 키위(キウイ)	키위(キウィー) 키위(キーウィー)	키위잼(キウイジャム) 키위잼(キーウィージャム)	키위소스(キウイソース) 키위소스(キーウィー ソース)
소고기 (牛肉)	소 소고기(ぎゅうにく) 소고기(牛にく)	소고기(ビーフ) 소고기(ぎゅう肉)	소힘줄 소고기크로켓	소기름
참깨 (ごま)	참깨(ゴマ)	참깨(胡麻)	참깨유 빻은 참깨(すりゴマ) 참깨페이스트 (ゴマペースト)	참깨페이스트(練り ごま) 빻은 참깨 (切り胡麻)
연어 (さけ)	연어(鮭) 연어(サーモン) 연어(シャケ)	연어(サケ) 연어(しゃけ)	연어플레이크 Sockeye salmon(홍연어)	훈제연어 구운연어
고등어 (さば)	고등어(鯖)	고등어(サバ)	훈제고등어포	고등어초밥
대두 (大豆)	대두(だいず)	대두(ダイズ)	삶은대두 대두유	대두단백 탈지대두
닭고기 (鶏肉)	닭고기(とりにく) 닭고기(鳥肉) 닭(鳥) 닭(チキン)	닭고기(とり肉) 닭(鶏) 닭(とり)	닭꼬치구이 닭간 치킨스프	로스트치킨 치킨스톡 닭육수
바나나 (バナナ)	바나나(ばなな)		바나나주스	
피스타치오 (ピスタチオ)	피스타치오 너트(ピスタチオナッツ)			
돼지고기 (豚肉)	돼지고기(ぶたにく) 돼지고기(ぶた肉) 돼지고기(ポーク)	돼지고기(豚にく) 돼지(豚)	돼지고기 비엔나 돼지고기 다짐육	돼지고기 생강구이
마카다미아 (マカダミア ナッツ)	마카다미아 너트(マカデミアナッツ)			
복숭아 (もも)	복숭아(モモ) 복숭아(ピーチ)	복숭아(桃)	복숭아과즙 백도	황도 복숭아페이스트
참마 (やまいも)	참마(山芋) 참마(山いも)	참마(ヤマイモ)	참마(채 썬 것)	
사과 (りんご)	사과(リンゴ)	사과(アップル)	사과파이 구운 사과	사과식초 사과사탕
젤라틴 (ゼラチン)			판젤라틴	분말젤라틴

별첨 알레르겐을 함유하는 식품의 검사방법

서문

본 검사법은 특정 원재료 등의 표시 제도를 과학적으로 검증하기 위하여 현시점에서 가장 신뢰성이 높다고 판단되는 방법으로 구성한 것이다. 해당 검사의 대상 검체는 유통되는 식품원료, 첨가물 및 가공식품이지만 본 검사법을 모든 식품에 적용하는 것은 사실상 불가능하다. 계속해서 응용 사례를 축적해서 문제점을 개정해 나갈 것이므로 유의하기 바란다.

또한 가공에 의해 특정 원재료 성분이 변화 또는 분해되거나 식품으로부터 특정 원재료 성분을 추출하는 효율이 변동되어 본 검사법을 통해 특정 원재료의 총 단백질 함유량을 측정한 결과는 실제 함유량과 반드시 정확하게 일치하지 않을 수 있다.

1. 검사 원칙 및 시료 조제법

1.1. 검사 원칙

본 검사는 다양한 가공식품을 대상 검체로 하므로 그 성상에 따라 측정 결과가 달라진다. 이를 줄이기 위한 원칙은 다음과 같다.

- 검사대상 검체는 1포장을 한 단위로 한다.
- 검사대상 검체 중 먹을 수 없는 부분을 폐기한 먹을 수 있는 부분을 시료로 사용한다.
- 시료 속의 특정 원재료 성분은 불균일하게 분포되어 있을 것으로 예측되므로, 검사에 사용하기 전에 균질화를 실시한다.
- 균질화 한 시료를 조제시료로 사용한다.
- 검사에 사용하는 조제시료는 고체 또는 액체의 성상과 관계없이 중량 측정을 통해 일정량을 채취한다.
- 시료 조제를 포함한 검사 전반은 공기의 움직임이 없고 온도, 습도의 변화가 적은 장소에서 실시한다.
- 미량을 측정하므로 분쇄기, 푸드커터, 계량용 기구는 중성세제 등으로 세정 후에 알칼리 세제에 하룻밤 담가두거나 초음파 세정기를 사용하여 30분간 초음파 처리한다.
- 시료의 조제와 검사는 구분된 공간에서 실시하여 오염을 방지한다.

1.2. 시료 조제법

식품 1포장 단위에 포함된 먹을 수 있는 부분 전체를 시료로 한다. 그 다음 시료 전량을 분쇄기 또는 푸드커터 등*으로 충분히 분쇄하여 균질하게 섞은 후 조제시료로 사용한다.

* ACE HOMOGENIZER-AM-11(일본정기제작소), Retsch GM20(RETSCH사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

주)

- ① 인스턴트식품(컵라면, 컵스프 등) 중에는 스프, 건더기 및 면 등으로 따로 포장된 것이

있다. 그와 같은 포장 형태의 인스턴트식품은 전체를 1포장 단위로 간주하여 따로 포장된 것을 모두 혼합하고 균질화한 후 조제시료로 사용한다.

② 시판 도시락과 같이 조합된 식품은 도시락 전체를 1포장 단위로 간주하여 밥, 반찬 및 따로 포장된 조미료 등 전체를 혼합하고 균질화한 후 조제시료로 사용한다.

2. 특정 원재료 등의 검사방법

특정 원재료 등의 검사방법은 다음을 충족해야 한다.

- 정량검사법에서는 실험실 수 8 이상, 시료 수 5 이상(단, 시료에 포함된 특정 원재료 단백질 농도에는 $10\mu\text{g/g}$ 을 포함할 것)으로 실시한 실험실간 밸리데이션에서 50% 이상, 150% 이하의 회수율 및 25% 이하의 재현성을 보여야 한다.
- 정성검사법에서는 실험실 수 6 이상, 시료 수 5 이상으로 실시한 실험실간 밸리데이션에서 특정 원재료 단백질을 포함하는 시료의 양성률이 90% 이상, 공시료(Blank)의 음성률이 90% 이상이어야 한다. 정량검사법보다 특이성이 높다는 것을 보여주는 데이터가 제시되어야 한다. 또한 특정 원재료 단백질을 포함하는 시료의 단백질 농도에는 $10\mu\text{g/g}$ 을 포함하는 것이 바람직하다.
- 이 실험실간 밸리데이션의 결과 및 위양성, 위음성에 관한 데이터는 설명서 등에 첨부하여 공표해야 한다.
- 이 검사방법의 평가는 별첨 4 <알레르겐을 함유하는 식품의 검사방법을 평가하는 가이드라인>에 준거해야 한다.

2.1. 정량검사법

2.1.1. 정량검사법의 개요

식품의 특정 원재료 등에서 유래한 단백질을 정량적으로 검출하는 방법이다. 일반적으로는 항원항체반응을 이용한 효소면역측정법(ELISA)이 사용된다.

효소면역측정법 이외의 정량검사법을 사용할 수도 있으나 그 경우에는 효소면역측정법과 동등하거나 그 이상의 성능을 지닌 검사법을 사용해야 한다.

검사 조작은 시약 및 주의사항에 관한 내용을 포함해서 각 검사 설명서에 기재된 방법에 따라 실시한다.

2.1.2. 정량검사법의 결과 판정

식품 채취중량 1g당 특정 원재료 등에서 유래한 단백질 함량이 $10\mu\text{g}$ 이상인 시료는 미량을 초과하는 특정 원재료가 혼입되어 있을 가능성이 있는 것으로 판단한다.

(단, 새우와 게는 이를 구별할 수 없어 갑각류로 함께 검출된다)

첫 측정을 실시한 결과 얻은 수치가 $8\text{--}12\mu\text{g/g}$ 의 범위 내에 있는 경우에는 다시 동일한 조제 시료로 두 번째 측정을 실시한다. 측정결과의 판정은 첫 측정에서 얻은 수치와 두 번째 측정에서 얻은 수치를 평균한 값으로 한다. 조제시료에서 두 번째 시료를 채취할 수 없는 경우에는 본 검사의 다른 검체를 사용하여 검사를 실시한다.

또한 효소면역측정법을 사용하는 경우에는 다음과 같은 점에 주의한다.

- 효소면역측정법으로 얻은 측정결과에서 3월간 CV값이 20% 이상을 나타내는 경우에는 효소면역측정법 이후의 조작을 다시 한 번 실시한다.
- 각 농도의 표준액으로부터 얻은 측정값에 4-parameter logistic curve를 피팅하여 얻은 검량선으로부터 각 웰의 특정 원재료 등 유래 단백질 농도를 산출해서, 얻은 그 값에 각 검사별로 정해진 희석배율을 곱해서 식품채취 중량당 특정 원재료 등 유래 단백질 양을 산출한다.

2.2. 정성검사법

2.2.1. 정성검사법의 개요

정성검사법에는 웨스턴블롯법, 중합효소연쇄반응법(PCR법), Real-time PCR법, PCR-핵산 크로마토그래피와 LC-MS/MS법이 있다. 일반적으로 알(卵), 유(乳)에는 웨스턴블롯법을 사용하고 새우, 계에는 PCR법, 밀, 메밀, 땅콩에는 PCR법 또는 Real-time PCR법, 호두에는 Real-time PCR법 또는 PCR-핵산크로마토그래피, 캐슈너트에는 Real-time PCR법, PCR-핵산 크로마토그래피, 또는 LC-MS/MS법을 사용한다.

웨스턴블롯법, PCR법, Real-time PCR법, PCR-핵산크로마토그래피 및 LC-MS/MS법 이외의 정성검사법을 사용할 수도 있으나 그 경우에는 상기 검사법과 동등하거나 그 이상의 성능을 지닐 것.

검사 조작은 시약 및 주의사항을 포함해서 각 검사 설명서에 기재된 기법에 따라 실시한다.

2.2.2. 웨스턴블롯법

웨스턴블롯법으로는 각 특정 원재료 등 유래 단백질의 분자량(S DS-PAGE의 평균분자량: 난알부민 M.W. 50,000, 오보뮤코이드 M.W. 38,000, 카제인 M.W. 33,000-35,000, β-락토글로불린 M.W. 18,400) 부근에 뚜렷한 밴드가 검출된 것을 양성으로 판정한다. 적절히 표준액의 밴드 위치를 참조하여 판정한다. 양성 대조를 위해 검사 대상 알(卵) 또는 유(乳)의 표준액(1μg/mL)이 검출되었는지 확인한다. 표준액(1μg/mL)이 검출되지 않은 경우에는 검사가 부적절한 것으로 간주하여 시료 조제부터 다시 한 번 실시한다. 난류단백질을 측정할 때는 난알부민 또는 오보뮤코이드를 이용하고 유단백질을 측정할 때는 카제인 또는 β-락토글로불린 중 어느 하나의 항체를 이용하며, 양성인 경우에는 각 특정 원재료(알, 유)가 미량을 초과하여 혼입되어 있다고 판정한다.

2.2.3. PCR법

식품에서 DNA를 추출하여 얻은 DNA시료액을 사용하여 다음과 같은 정성적 PCR을 실시한다. 더불어 DNA 추출은 1개의 조제시료당 2개를 병행 실시하고, 이후 PCR 증폭 산물이 확인되기까지의 모든 조작은 그 2개에 대해서 독립적으로 병행 실시한다.

2.2.3.1. 시료조제법

1.1. 및 1.2.에 따라 시료를 조제한다.

단, 시료 중 믹서 밀 등을 이용한 단순한 분쇄로는 균질화가 어려운 것은 균질화 처리 과정에서 시료에 같은 중량의 물을 첨가하여 충분히 균질화한다. 그 후에 동결건조 처리를 해서 다시 한 번 분쇄한 것을 조제시료로 사용한다. 또한 시료가 액체인 경우에는 믹서 밀 등을 사용하여 균질화한 후 동결건조 처리하고, 그것을 다시 믹서 밀 등으로 분쇄한 것을 조제시료로 사용한다.

2.2.3.2. DNA 추출·정제법

계면활성제 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB)와 페놀/클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출 정제하는 CTAB법은 응용범위가 넓고 PCR 저해물질이 잔존하기 어려워 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 매우 우수한 방법이나, 클로로포름 등의 유해 시약과 복잡한 정제조작이 필요하다. 이에 비하여 시판 DNA 추출키트를 사용하면 비교적 간단히 DNA를 추출 정제할 수 있다. 시판 DNA 추출키트에는 실리카겔 막 형태 키트, 이온교환수지 형태 키트 등이 있다. 이 키트들은 각각의 특징이 있으므로 각 검사 대상 검체에 맞는 방법으로 DNA를 추출한다. 본 항에서는 CTAB법과 실리카겔 막 형태 키트(DNeasy Plant Mini, QIAGEN사), 이온교환수지 형태 키트(Genomic-Tip 20/G, QIAGEN사)를 사용한 정제법을 기술한다.

DNA 추출 정제 시에 사용하는 물은 특별한 지침이 없는 한 모두 역침투막 정제한 RO 수 또는 증류수를 Milli-Q 등으로 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수(Ultrapure Water)를 121℃에서 20분 이상의 조건으로 고압증기멸균한 것을 사용한다.

2.2.3.2.1. 실리카겔 막 형태 키트법^{*1}

조제시료 2g을 폴리프로필렌 원심관(용량 50mL)에 계량하여 담은 후^{*2}, 동일한 원심관에 65℃에서 미리 가온해 둔 API 완충용액 10mL와 RNase A 10μL를 넣는다. 그 후 시료 덩어리가 남지 않도록 교반기로 강하게 혼합하고, 65℃에서 15분간 가온한다. 그동안 원심관은 수차례 반전시켜 시료를 교반한다. 가온처리 후 AP2 완충용액 3,250μL를 첨가하여 실온에서 5분간 가만히 두었다가 실온, 3,000×g의 조건에서 5분간 원심분리한다. 원심분리가 끝난 후에는 맑은 상층액을 신속히 다른 원심관으로 옮긴다. 그 다음, 원심관으로 옮긴 상층액을 QIAshredder spin column에 넣어 실온, 10,000×g의 조건에서 2분간 원심분리한다. 이렇게 얻은 용출액은 새로운 폴리프로필렌 원심관(용량 15mL)에 옮겨놓는다. 이때, 1회당 넣는 양은 500μL로 하고, 위에 뜬 맑은 액체 중 3mL를 다 넣을 때까지 수차례 반복한다. 최종적으로 얻은 용출액에 용출액 양의 1.5배에 해당하는 AP3 완충용액, 에탄올 혼합액^{*3}을 첨가하고 10초간 교반기로 교반하여 용해액을 얻는다. 이렇게 얻어진 용해액 중 500μL를 mini spin column에 넣고 실온, 10,000×g의 조건에서 1분간 원심분리하여 용출액을 버린다. 그 다음, 나머지 용해액 중 500μL를 동일한 mini spin column에 넣어 같은 조건으로 원심분리하여 용출액을 버린다. 최종적으로 용해액에 모두 없어질 때까지 동일한 조작을 반복한 다음, column에 AW 완충용액 500μL를 넣어 실온, 10,000×g의 조건에서 1분간 원심분

리한다. 이렇게 얻어진 용출액을 버리고 동일한 조작을 다시 한 번 반복한다. 용출액을 버린 후 mini spin column을 건조시키기 위해 실온, 10,000×g 이상으로 15분간 원심분리한다. 건조처리 후에 mini spin column을 키트에 부착된 원심관에 옮기고 미리 65℃에서 가온해 둔 물 50μL를 첨가하여 5분간 가만히 두었다가 실온, 10,000×g의 조건에서 1분간 원심분리하여 DNA를 용출한다. 이것을 다시 한 번 동일한 용출조작 후 얻어진 용출액과 합하여 DNA 시료원액(총 100μL)으로 한다.

*1 본 방법은 주로 가공을 많이 하지 않은 검사 대상 검체(밀가루, 메밀가루, 땅콩 분쇄물 및 그에 준하는 가공식품)에 적용할 수 있다. 가공도가 높고 당 및 유지성분의 함량이 높은 검사 대상 검체에서는 DNA의 정제도가 낮아 충분한 DNA의 양이 추출되지 않을 수 있다는 점에 유의한다. 또한 본 방법을 통해 DNA가 추출되지 않는 조제시료는 2.2.3.2.2.의 이온교환수지 형태 키트법을 사용하여 DNA 추출을 시도한다.

*2 시료의 조제, 채취는 2.2.3.1의 방법에 따른다.

*3 AP3 완충용액·에탄올 혼합액

AP3 완충용액과 에탄올(96-100 %)을 1:2(V/V)의 비율로 혼합한 것을 AP3 완충용액·에탄올 혼합액으로 사용한다.

2.2.3.2.2. 이온교환수지 형태 키트법^{*1}

조제시료 2g을 폴리프로필렌 원심관(용량 50mL)에 계량하여 넣는다^{*2}. 동일한 원심관에 G2 완충용액^{*3} 7.5 mL를 첨가하여 교반기로 강하게 혼합한 후, G2 완충용액 7.5 mL 및 α-아밀라아제^{*4} (1mg/mL) 200μL를 첨가하여 다시 한 번 교반기로 혼합한다. 혼합처리 후 37℃에서 1시간 가온한다. 그 사이에 원심관을 수차례 반전시켜 시료를 교반한다. 가온처리 후 Proteinase K^{*5} 100μL 및 RNase A 20μL를 첨가하여 교반기로 혼합한 후 50℃에서 2시간 가온한다. 그 사이에 원심관을 수차례 회전시키면서 시료를 교반한다. 그 다음, 저온(4℃), 3,000×g 이상의 조건에서 15분간 원심분리한다. 원심분리가 끝난 후 얻은 상층액을 폴리프로필렌 원심관(용량 15mL)으로 옮긴다. 옮긴 후 용액 속에 부유하는 잔존물을 제거하기 위하여 다시 한 번 가볍게 원심분리한다. 이 원심분리 조작을 실시하는 동안 QIAGEN사의 Genomic-Tip 20/G를 QBT 완충용액^{*3} 1mL로 평형화한다. 원심분리 종료 후 상층액을 평형화가 완료된 Genomic-Tip 20/G에 2mL씩 수차례에 나누어 넣는다. 상층액을 모두 다 넣은 후에는 tip에 QC 완충용액^{*3} 2mL를 넣어 세정한다. 동일한 세정조작을 총 3회 반복한 후 tip을 새로운 폴리프로필렌 원심관(용량 15mL)으로 옮긴다. 세정이 끝난 tip에 미리 50℃에서 가온해 둔 QF 완충용액^{*3} 1mL를 넣어 DNA를 용출한다. 동일한 tip에 다시 한 번 동일한 용출조작을 실시한다. 이렇게 얻어진 2mL의 용출액에 0.7배 양의 이소프로필알코올을 넣어 잘 혼합하고 저온(4℃), 10,000×g 이상으로 15분간 원심분리한 후, 침전^{*6}이 제거되지 않도록 주의하면서 맑은 상층액만 제거한다. 상층액을 제거한 후의 원심관에 70% 에탄올 1mL를 넣고 저온(4℃), 10,000×g 이상으로 5분간 원심분리한다. 상층액을 버리고 남은 침전을 건조시키기 위하여 아스피레이터를 사용하여 5분 정도 진공건조 처리한다. 이때 완전히 건조하지 않도록 주의한다. 침전이 건조된 것을 확인한 후 물 100μL를 첨가하여 65℃, 5분

간의 조건으로 가온처리하고 피펫으로 분주하여 DNA를 용해시킨 것을 DNA시험원액으로 사용한다.

- *1 본 방법은 주로 가당, 유지처리, 가열혼합, 발효 등의 처리가 이루어진 가공도가 높은 검사 대상 검체에 적용할 수 있다. 또한 본 방법을 통해 DNA가 추출되지 않는 조제시료는 2.2.3.2.1.의 실리카겔 막 형태 키트법을 사용하여 DNA 추출을 시도한다.
- *2 시료의 조제, 채취는 2.2.3.1의 방법에 따른다.
- *3 G2 완충용액, QBT 완충용액, QC 완충용액 및 QF 완충용액은 키트에 부속되어 있으나 부족한 경우에는 키트의 설명서에 따라 조제할 수 있다.
- *4 SIGMA사의 제품(Cat. No. A-6380) 또는 그와 동등한 효력을 지닌 것을 사용한다.
- *5 QIAGEN사의 제품(Cat. No. 19133) 또는 그와 동등한 효력을 지닌 것을 사용한다.
- *6 이 침전이 바로 추출된 DNA이다. 검사 대상 검체에 따라서는 DNA가 극히 미량밖에 추출되지 않아 육안으로 볼 수 없는 경우가 있으나, 원심관 바닥에는 침전이 있다는 점에 주의하면서 조작을 실시한다.

2.2.3.2.3. CTAB법^{*1}

조제시료 2g을 폴리프로필렌 원심관(용량 50mL)에 계량하여 넣고 동일한 원심관에 CTAB buffer^{*2} 15mL를 첨가하여 균질기로 혼합한다. 원심관의 가장자리 및 균질기의 끝부분을 세정하듯이 CTAB 완충용액 30mL를 첨가하여 전도혼합한 후 55℃에서 30분간 가온한다. 가온처리 후 용액을 교반하여 균질해진 용액 600μL를 마이크로원심관(용량 1.5mL)에 계량하여 담는다. 그 다음, 계량하여 담은 용액에 500μL의 페놀/클로로포름 혼합액^{*3}을 첨가하여 전도혼합한 후, 교반기로 가볍게 현탁한다. 현탁 후 7,500×g, 실온 조건에서 15분간 원심분리하여, 위쪽에 분리된 상층액을 새로운 마이크로원심관으로 옮긴다. 이때 중간층을 건드리지 않도록 주의한다. 옮겨 놓은 물 층에 다시 500μL의 클로로포름/이소아밀알코올 혼합액^{*4}을 첨가하여 전도혼합한 후, 교반기로 가볍게 현탁한다. 현탁 후 7,500×g, 실온 조건에서 15분간 원심분리하여, 위쪽에 분리된 물 층(상층)을 새로운 마이크로원심관으로 옮긴다. 옮긴 용액에 동일한 용량의 이소프로필알코올(실온)을 첨가하여 전도혼합한 후 7,500×g, 실온 조건에서 15분간 원심분리하고, 침전에 유의하면서 혼합물 분리 기법(decantation)을 실시하여 상층액을 버린다. 그 다음, 500μL의 70% 에탄올을 벽면으로 천천히 흘려 넣어 7,500×g, 실온 조건에서 1분간 원심분리한다. 원심분리 후 침전에 닿지 않도록 가능한 한 에탄올을 흡입하여 버린다. 원심관에 남은 침전을 건조시키기 위하여 아스피레이터로 2~3분간 진공건조 처리한다. 이때 완전히 건조되지 않도록 주의한다. 50μL의 TE 완충용액^{*5}을 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에서 15분간 가만히 놓아둔다. 그 사이 수차례 전도혼합하여 침전이 완전히 용해되도록 한다. 이렇게 얻어진 용해액에 RNase A 5μL를 첨가하여 37℃에서 30분간 가온한다. 가온처리 후의 용액에 200μL의 CTAB 완충용액, 250μL의 클로로포름/이소아밀알코올 혼합액을 첨가하여 전도혼합한 후 교반기로 가볍게 현탁한다. 현탁 처리 후 7,500×g의 실온에서 15분간 원심분리하여 분리된 물 층(상층)을 새로운 마이크로원심관으로 옮긴다. 이때 중간층을 건드리지 않도록 주의한다. 옮겨놓은 용액에 200μL의 이소

프로필알코올을 첨가하여 전도혼합한 후 7,500×g, 실온에서 10분간 원심분리하고, 침전에 유의하면서 혼합물 분리기법(decantation)을 실시하여 상층액을 버린다. 그 다음, 200μL의 70% 에탄올을 벽면에서부터 천천히 흘러 넣어 7,500×g, 실온에서 1분간 원심분리한다. 원심분리 후 침전에 닿지 않도록 가능한 한 에탄올을 흡입하여 버린다. 원심관에 남은 침전을 건조시키기 위하여 아스피레이터로 2~3분간 진공건조처리를 실시한다. 이때 완전히 건조되지 않도록 주의한다. 50μL의 물을 첨가하여 혼합한 후 실온에서 15분간 가만히 놓아둔다. 그 사이 수차례 전도혼합하여 침전이 용해되도록 한다. 완전히 용해된 것을 DNA시료원액으로 사용한다.

*1 실리카겔 막 형태 키트법 및 이온교환수지 형태 키트법을 실시하고 그 결과, 2.2.3.2.4.의 방법으로 정량을 실시해서 충분한 양의 DNA가 추출되지 않았을 경우에 실시한다.

*2 CTAB 완충용액

비커에 8mL의 0.5mM EDTA(pH 8.0), 20mL의 1 M Tris/염산(pH 8.0) 및 56mL의 5M NaCl 수용액을 계량하여 넣고 혼합한 후 약 150mL가 되도록 물을 첨가한다. 이 용액에 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB) 4g을 교반하면서 첨가하여 완전히 용해시킨다. 여기에 물을 첨가하여 전체 양이 200mL가 되도록 한 후, 고압증기멸균기로 멸균한 것을 CTAB 완충용액으로 사용한다.

*3 페놀/클로로포름 혼합액

1M Tris/염산(pH 8.0) 포화페놀과 클로로포름/이소아밀알코올을 1:1(v/v)의 비율로 혼합한 것을 페놀/클로로포름 혼합액으로 사용한다.

*4 클로로포름/이소아밀알코올 혼합액

클로로포름과 이소아밀알코올을 24:1(v/v)의 비율로 혼합한 것을 클로로포름/이소아밀알코올 혼합액으로 사용한다.

*5 TE 완충액

각각의 최종농도가 10mM Tris/염산(pH 8.0), 1mM EDTA(pH 8.0)이 되도록 물을 사용하여 조제한 것을 TE 완충용액으로 사용한다.

2.2.3.2.4. DNA 정제도의 확인과 정량분석

DNA 시료원액 5μL에 TE buffer 45μL를 첨가하여 50μL를 만든 후 200-320nm의 범위에서 자외흡수스펙트럼을 측정한다. 이때 230nm, 260nm 및 280nm의 흡광도(O.D. 230, O.D. 260 및 O.D. 280*)를 기록한다. 그 다음 O.D. 260 값의 1을 50ng/μL DNA로 하여 DNA 농도를 산출한다. 또한 O.D. 260/O.D. 280을 계산하여 그 비율이 1.2-2.5가 되는지 확인한다. 흡광도 비율이 1.2에 미치지 못하는 경우에는 다시 추출한다.

2.2.3.2.에 기재된 3종의 DNA 추출법 중 하나의 추출법을 사용하여 DNA 추출을 실시하고 흡광도를 측정한 결과 O.D.260 값으로 상당량의 DNA의 추출이 확인되지 않는 경우, 또는 상기 조건을 충족하는 DNA 시료원액의 품질이 확인되지 않는 경우에는 다른 추출법을 사용하여 추출 조작을 실시한다.

2.2.3.3.2.의 내용과 같이 원칙적으로 DNA 시료액은 20ng/μL의 농도로 조제하지만, 검사

대상 검체에 따라서는 DNA 추출 효율이 낮아 20ng/μL의 농도로 조제할 수 없는 경우가 있을 것으로 추정된다. 이러한 경우에는 20ng/μL와 가까운 농도로 조제하여 DNA 시료액으로 사용한다. 또한 O.D. 260/O.D. 280의 흡광도 비율은 원칙적으로 1.2-2.5의 범위에 있어야 하지만, 3종의 추출법을 실시하여도 상기 조건을 충족하는 DNA가 추출되지 않는 경우에는 원칙상의 O.D. 260/O.D. 280 흡광도 비율 범위인 1.2-2.5와 가장 가까운 값을 나타낸 DNA 시료원액으로 DNA 시료용액을 제조하여 PCR 증폭을 실시한다.

* O.D. 230 값은 당, 페놀 등의 저분자화합물에 의한 흡광도이며 O.D. 260 / O.D. 230을 계산한다. 이 비율이 2.0에 미치지 못하는 경우에는 상기 불순물의 영향에 의하여 PCR반응이 잘 일어나지 않을 수 있다. O.D. 260은 DNA에 의한 흡광도, O.D. 280은 단백질 등 불순물에 의한 흡광도로 추정된다.

2.2.3.3. 정성적 PCR법

정성적 PCR법은 추출된 DNA에 포함된 목적염기배열 영역을 프라이머라 불리는 올리고뉴클레오타이드를 이용해서 polymerase chain reaction(PCR)*으로 증폭시켜, 그 증폭 산물을 전기영동법으로 분리, 염색하여 검출한다. 본 방법으로 검사 대상인 특정 원재료를 특이적으로 검지할 수 있으며, 증폭 산물의 유무에 따라 검사 대상 검체 속의 특정 원재료 유무를 판정한다.

* PCR에서는 주형 DNA가 극미량이라도 존재하면 목적으로 하는 염기배열 영역이 증폭될 수 있다. 따라서 실제 실험조작 및 평소 실험환경 보전 시에는 DNA(특히 PCR 증폭 산물)의 혼입에 충분히 주의해야 한다. 또한 DNA는 인간의 피부 표면으로부터 분비되는 DNA 분해효소에 의해 분해되기 때문에 해당 효소의 혼입을 방지해야 한다. 이러한 점을 고려하여 사용하는 튜브 및 팁은 사용 직전에 121℃에서 20분 이상 고압증기멸균한 것을 사용하고 재사용하지 않는다. 멸균된 필터가 있는 팁을 사용하되 재사용하지 않는 것도 의도치 않은 DNA의 혼입 방지에 유효하다.

또한 정성적 PCR법에 사용하는 물은 특별한 지침이 없는 한 모두 역침투막정제한 RO수 또는 증류수를 Milli-Q 등으로 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수를 121℃, 20분 이상의 조건으로 고압증기멸균한 것을 사용한다.

2.2.3.3.1. PCR 증폭

정성적 PCR법으로 검출 가능한 특정 원재료는 땅콩, 밀, 메밀, 새우, 계의 5종이며, 각각에 대한 PCR 증폭 조건이 다르다. 2.2.3.3.2.부터 2.2.3.3.6.까지 기재된 PCR 증폭 조건 중 검출 대상인 특정 원재료 중에 맞는 PCR 조건을 사용하여 검사를 실시한다. 또한 각 검사는 모두 1개의 조제시료에서 2개가 병행 추출된 DNA를 각각 규정농도로 조제한 후 PCR법의 주형DNA로 제공한다. PCR 증폭은 우선 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍^{*1*}또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍^{*2*}을 사용하여 실시하고 그 결과를 2.2.3.5.에 기재된 판정의 예와 대조하여 판정한 후, 그 판정에 준하여 각 특정 원재료 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 2번째 PCR 증폭을 실시한다

*1 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 및 증폭밴드 길이*는 다음과 같다.

식물 DNA 검출용 프라이머 쌍

F-primer (CP03-5'): 5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3'

R-primer (CP03-3'): 5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3'

증폭밴드 길이

124bp

사용기기, 반응액의 조제법 및 PCR 반응조건은 모두 2.2.3.3.2.의 땅콩 검지를 위한 PCR 증폭과 동일하다.

2 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍, 증폭밴드 길이 및 반응조건 등은 다음과 같다.

동물 DNA 검출용 프라이머 쌍

F-primer

AN1-5': 5'-TGA CCG TGC GAA GGT AGC-3'

AN2-5': 5'-TAA CTG TGC TAA GGT AGC-3'

AN1-5' 및 AN2-5'를 1:1의 비율로 혼합하여 사용한다.

R-primer(AN-3'): 5'-CTT AAT TCA ACA TCG AGG TC-3'

증폭밴드 길이

370-470 bp

PCR용 반응시료관에 다음과 같이 반응액을 조제한다. 반응액은 1xPCR 완충용액*, 0.20mM dNTP, 3.0mM 염화마그네슘, 0.625 units Taq DNA polymerase 및 0.2μM 5' 및 3'프라이머를 포함하는 액체에 20ng/μL로 조제한 DNA 시료액* 2.5μL(DNA로는 50 ng)를 첨가하여 전체 양을 25μL로 한다. 그 다음, 반응시료관을 PCR 증폭장치*에 세팅한다.

반응조건은 다음과 같다. 95℃에 10분간 두어 반응이 시작되도록 한 후 95℃에서 0.5분, 50℃에서 0.5분, 72℃에서 0.5분을 1사이클로 하여 40사이클의 PCR 증폭을 실시한다. 그 다음, 종료반응으로 72℃에서 7분간 두었다가 4℃에서 보존하여 얻어진 반응액을 PCR 증폭반응액으로 한다. PCR 반응의 공시험반응액으로 프라이머 쌍을 넣지 않는 것과 DNA 시료액을 넣지 않는 것도 반드시 동시에 조제한다.

PCR 완충용액, Taq DNA polymerase, DNA 시료액, PCR 증폭장치는 2.2.3.3.2의 땅콩 검지를 위한 PCR 증폭 항을 참조한다.

*3 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍은 널리 식물 DNA 또는 동물 DNA를 검지하기 위하여 설계되었다. 그로 인해 식물계 또는 동물계에 널리 분포하고 있으며 고도로 보존된 유전자를 표적유전자로 선정하였으나 완전히 보존되어 있지 않고 식물 간 또는 동물 간에 염기배열의 삽입이나 결여가 보이는 경우도 있다. 이로 인해 검사 대상 검체에 따라서는 얻어지는 증폭밴드 길이에 약간의 차이가 있을 수 있으므로 주의한다. 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍은 검사 대상 검체의 원재료 특성에 따라 선택한다.

2.2.3.3.2. 땅콩 검지를 위한 PCR 증폭

PCR용 반응시료관에 다음과 같이 반응액을 조제한다. 반응액은 1xPCR 완충용액^{*1}, 0.20mM dNTP, 1.5mM 염화마그네슘, 0.2μM 5' 및 3' 프라이머^{*2} 및 0.625 units Taq DNA polymerase^{*3}를 포함하는 액체에 20ng/μL로 조제한 DNA 시료액^{*4} 2.5μL(DNA로는 50ng)를 첨가하여 전체 양을 25μL로 한다. 다음으로 반응시료관을 PCR 증폭장치^{*5}에 세팅한다. 반응조건은 다음과 같다. 95℃에서 10분간 두어 반응이 시작되도록 한 다음, 95℃에서 0.5분, 60℃에서 0.5분, 72℃에서 0.5분을 1사이클로 하여 40사이클의 PCR 증폭을 실시한다. 그 다음, 종료반응으로 72℃에서 7분간 두었다가 4℃에서 보존하여 얻어진 반응액을 PCR 증폭반응액으로 사용한다. PCR 반응의 공시험반응액으로 프라이머 쌍을 넣지 않는 것과 DNA 시료액을 넣지 않는 것도 반드시 동시에 조제한다. 검사절차로는 우선 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 PCR 증폭을 실시하고, 그 결과로부터 PCR 증폭에 필요한 품질을 갖춘 DNA가 검출되었는지 확인한다. 그 다음, 2.2.3.5.에 기재된 판정의 예에 따라 땅콩 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 PCR 증폭을 실시한다.

***1 PCR 완충용액**

PCR buffer II(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

***2 땅콩 검출용 프라이머 쌍 및 증폭밴드 길이는 다음과 같다.**

검출용 프라이머 쌍

F-primer(agg04-5'): 5'-CGA AGG AAA CCC CGC AAT AAA T-3'

R-primer(agg05-3'): 5'-CGA CGC TAT TTA CCT TGT TGA G-3'

증폭밴드 길이

95 bp

***3 Taq DNA polymerase**

AmpliTaq Gold DNA polymerase(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

***4 원칙적으로 DNA 시료액은 20ng/μL의 농도로 조제하지만, 검사 대상 검체에 따라서는 DNA 추출 효율이 낮아서 그 이하의 농도로 조제할 수밖에 없는 경우가 있을 것으로 추정된다. 그와 같은 경우에는 원칙에 가장 가까운 최대 농도로 조제하여 DNA 시료액으로 사용한다.**

***5 PCR 증폭장치**

GeneAmp PCR System 9600, 9700(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

2.2.3.3.3. 메밀 검지를 위한 PCR 증폭

사용기기, 반응액의 조제법 및 PCR 반응조건은 모두 2.2.3.3.2.에 기재된 땅콩 검지를 위한 PCR 증폭과 동일하다. 또한 5' 및 3' 프라이머를 메밀 검출용 프라이머 쌍으로 변경한다는 점을 제외하고 반응액 조성도 동일하다.

*** 메밀 검출용 프라이머 쌍 및 증폭밴드 길이는 다음과 같다.**

검출용 프라이머 쌍

F-primer(FAG19-5'): 5'-AAC GCC ATA ACC AGC CCG ATT-3'

R-primer(FAG22-3'): 5'-CCT CCT GCC TCC CAT TCT TC-3'

증폭밴드 길이

127 bp

2.2.3.3.4. 밀 검지를 위한 PCR 증폭

사용기기, 반응액의 조제법 및 PCR 반응조건은 모두 2.2.3.3.2.에 기재된 땅콩 검지를 위한 PCR 증폭과 동일하다. 또한 5' 및 3'프라이머를 밀 검출용 프라이머 쌍으로 변경한다는 점을 제외하고 반응액 조성도 동일하다.

* 밀 검출용 프라이머 쌍 및 증폭밴드 길이는 다음과 같다.

검출용 프라이머 쌍

F-primer(Wtr01-5'): 5'-CAT CAC AAT CAA CTT ATG GTG G-3'

R-primer(Wtr10-3'): 5'-TTT GGG AGT TGA GAC GGG TTA-3'

증폭밴드 길이

141 bp

2.2.3.3.5. 새우 검지를 위한 PCR 증폭^{*1}

PCR용 반응시료관에 다음과 같이 반응액을 조제한다. 반응액은 1×PCR 완충용액^{*2}, 0.20mM dNTP, 1.5mM 염화마그네슘, 0.625 units Taq DNA polymerase^{*4}, 및 0.3μM 5' 및 3' 프라이머^{*3}를 포함하는 액체에 20ng/μL로 조제한 DNA 시료액^{*5} 2.5μL(DNA로는 50ng)를 첨가하여 전체 양을 25μL로 만든다. 다음으로 반응시료관을 PCR 증폭장치^{*6}에 세팅한다. 반응조건은 다음과 같다. 95℃에 10분간 두어 반응이 시작되도록 한 후 95℃에서 1분, 56℃에서 1분, 72℃에서 1분을 1사이클로 하여 45사이클의 PCR 증폭을 실시한다. 그 다음, 종료반응으로 72℃에서 7분간 두었다가 4℃에서 보존하여 얻어진 반응액을 PCR 증폭반응액으로 사용한다. PCR 반응의 공시험반응액으로 프라이머 쌍을 넣지 않는 것과 DNA 시료액을 넣지 않는 것도 반드시 동시에 조제한다. 검사절차로는 우선 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 및 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 PCR 증폭을 실시하고, 그 결과로부터 PCR 증폭에 필요한 품질을 갖춘 DNA가 추출되었는지 확인한다. 그 다음, 2.2.3.5.에 기재된 판정의 예에 따라 새우 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 PCR 증폭을 실시한다.

*1 참게(*Eriocheir sinensis*), 던지니스게(*Metacarcinus magister*), 일본거미게(*Macrocheira kaempferi*), 홍게(*Chionoecetes japonicus*), West African geryon(*Chaceon maritae*), 꽃게(*Portunus trituberculatus*)는 새우 검지를 위한 PCR 증폭에서 증폭 산물이 검출되는 경우가 있음이 확인되었다. 이렇게 얻어진 PCR 증폭 산물이 새우에서 유래한 것인지 상리게에서 유래한 것인지 판정할 수 없는 경우에는 PCR 증폭 산물로 다음의 제한효소처리를 실시하여 판단한다.

PCR 증폭반응액 17μL, 제한효소 10×M buffer 2μL*, 제한효소 HaeIII 1μL*을 혼합하여

37℃에서 16시간 처리한다. 이렇게 얻어진 반응액을 2.2.3.4.의 아가로스 겔 전기영동으로 분석하여 새우 유래 제한효소의 소화단편(fragments)을 확인한다. 제한효소 10×M buffer 및 제한효소 HaeIII은 Takara Bio(주)의 제품 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

제한효소처리 단편(fragment)의 길이

149bp

단, 새우 DNA 검출용 프라이머 쌍은 갑각류인 십각목에 속하는 다양한 새우의 DNA 검출을 목적으로 설계되어 있어, 새우 종간에 염기배열의 삽입이나 결여가 보이는 것이 있다. 이로 인해 검사 대상에 따라서는 얻어지는 제한효소처리단편의 길이에 약간의 차이가 있을 수 있으므로 주의한다.

*2 PCR 완충용액

PCR buffer II(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*3 새우 검출용 프라이머 쌍 및 증폭밴드 길이는 다음과 같다.

검출용 프라이머 쌍

F-primer(ShH12-05'):

5'-TTA TAT AAA GTC TRG CCT GCC-3'

ShH12-05'는 3' 끝에서 8번째 염기를 A와 G의 혼합염기(R)로 합성한다.

R-primer(ShH13-03'):

ShH13-03' -1: 5'-GTC CCT CTA GAA CAT TTA AGC CTT TTC-3'

ShH13-03' -2: 5'-GTC CCT TTA TAC TAT TTA AGC CTT TTC-3'

ShH13-03' -3: 5'-GTC CCC CCA AAT TAT TTA AGC CTT TTC-3'

ShH13-03' -1, ShH13-03' -2, ShH13-03' -3을 1:1:1의 비율로 혼합하여 사용한다.

증폭밴드 길이

187 bp

새우 DNA 검출용 프라이머 쌍은 갑각류인 십각목에 속하는 다양한 새우의 DNA 검출을 목적으로 설계되어 있다. 따라서 새우 종간에 염기배열의 삽입이나 결여가 보이는 것이 있다. 이로 인해 검사 대상에 따라서는 얻어지는 증폭밴드 길이에 약간의 차이가 있을 수 있으므로 주의한다.

*4 Taq DNA polymerase

AmpliTaq Gold DNA polymerase(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*5 원칙적으로 DNA 시료액은 20ng/μL의 농도로 조제하나, 검사 대상 검체에 따라서는 DNA 추출 효율이 낮아서 그 이하의 농도로 조제할 수밖에 없는 경우가 있을 것으로 추정된다. 그와 같은 경우에는 원칙에 가장 가까운 최대 농도로 조제하여 DNA 시료액으로 사용한다.

*6 PCR 증폭장치

GeneAmp PCR System 9600, 9700, Veriti Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. GeneAmp PCR System 9700, Veriti Thermal Cycler를 사용하는 경우에는 9600 Emulation Mode로 실시한다.

2.2.3.3.6. 게 검지를 위한 PCR 증폭

PCR용 반응시료관에 다음과 같이 반응액을 조제한다. 반응액은 1 x PCR 완충용액^{*1}, 0.20 mM dNTP, 2.0mM 염화마그네슘, 0.2μM 5' 및 3' 프라이머^{*2} 및 0.625 units Taq DNA polymerase^{*3}를 포함하는 액체에 20ng/μL로 조제한 DNA 시료액^{*4} 2.5μL(DNA로는 50ng)를 첨가하여 전체 양을 25μL로 만든다. 그 다음, 반응시료관을 PCR 증폭장치^{*5}에 세팅한다. 반응조건은 다음과 같다. 95℃에 10분간 두어 반응이 시작되도록 한 후에 95℃에서 0.5분, 54℃에서 0.5분, 72℃에서 0.5분을 1사이클로 하여 40사이클의 PCR 증폭을 실시하고, 4℃에서 보존하여 얻은 반응액을 PCR 증폭반응액으로 사용한다. PCR 반응의 공시험 반응액으로 프라이머 쌍을 넣지 않는 것과 DNA 시료액을 넣지 않는 것도 반드시 동시에 조제한다. 검사절차로는 우선 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 및 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 PCR 증폭을 실시하고, 그 결과로부터 PCR 증폭에 필요한 품질을 갖춘 DNA가 추출되었는지 확인한다. 그 다음, 2.2.3.5.에 기재된 판정의 예에 따라 게 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 PCR 증폭을 실시한다.

*1 PCR 완충용액

PCR buffer II(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*2 게 검출용 프라이머 쌍 및 증폭밴드 길이는 다음과 같다.

검출용 프라이머 쌍

F-primer(CrH16-05'):

CrH16-05' -1: 5'-GCG TTA TTT TTT TTG AGA GTT CWT ATC GTA-3'

CrH16-05' -2: 5'-GCG TAA TTT TTT CTG AGA GTT CTT ATC ATA-3'

CrH16-05' -3: 5'-GCG TTA TTT TTT TTA AGA GTA CWT ATC GTA-3'

CrH16-05' -4: 5'-GCG TTA TTT CTT TTG AGA GCT CAT ATC GTA -3'

CrH16-05'-1 및 CrH16-05' -3는 3' 끝에서 8번째 염기를 A와 T의 혼합염기(W)로서 합성한다.

CrH16-05' -1, CrH16-05' -2, CrH16-05' -3, CrH16-05' -4를 10:1:6:3의 비율로 혼합하여 사용한다.

R-primer(CrH11-03'): 5'-TTT AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA AGT-3'

증폭밴드 길이

62 bp

*3 Taq DNA polymerase

AmpliTaq Gold DNA polymerase(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*4 원칙적으로 DNA 시료액은 20 ng/μL의 농도로 조제하지만, 검사 대상 검체에 따라서는 DNA 추출 효율이 낮아 그 이하의 농도로 조제할 수밖에 없는 경우가 있을 것으로 추정된다. 그와 같은 경우에는 원칙에 가장 가까운 최대 농도로 조제하여 DNA 시료액으로 사용한다.

*5 PCR 증폭장치

GeneAmp PCR System 9600, 9700, Veriti Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. GeneAmp PCR System 9700, Veriti Thermal Cycler를 사용하는 경우에는 9600 Emulation Mode로 실시한다.

2.2.3.4. 아가로스 겔 전기영동

PCR 증폭반응액을 아가로스 겔 전기영동으로 분석하여 DNA 증폭밴드를 확인한다.

2.2.3.4.1. 아가로스 겔의 제작

필요한 만큼 계량한 아가로스를 TAE 완충용액(TAE buffer)^{*1}에 넣고 가열하여 아가로스를 용해시킨다. 그 다음, 100mL당 5μL의 브로민화 에티뒀 용액(10mg/mL)^{*2}을 첨가하여 겔이 50℃ 전후로 식으면 겔 메이커에 부어, 실온에서 충분히 식히면서 굳혀 겔을 만든다^{*3}. 겔은 바로 사용하는 것이 좋으나 완충용액에 담귀두면 며칠간 보존이 가능하다. 겔의 농도는 영동하는 DNA의 길이에 따라 결정해야 하므로 영동하는 목적 산물의 밴드 길이에 맞춰 겔의 농도(2.0-4.0%)를 결정한다.(특정 원재료 검출에는 농도가 2.5-4.0인 아가로스 겔을 사용하는 것이 적당하다)

*1 TAE 완충용액

각각의 최종농도가 40mM Tris-초산, 1mM EDTA가 되도록 증류수를 사용하여 조제한 것을 TAE 완충용액으로 사용한다.

*2 브로민화 에티뒀

두 가닥의 DNA사슬 사이에 침투하는 형광시약으로, 강력한 발암작용과 독성이 있다. 취급 시에는 반드시 장갑과 마스크를 착용해야 한다.

*3 전염색

여기서는 전염색법에 대해서 기술한다. 이 단계에서 브로민화 에티뒀 용액을 첨가하지 않고 전기영동이 종료된 후 2.2.3.4.3에 기술된 후염색법에 따라 염색을 실시하여도 좋다. (예상 증폭밴드 길이가 짧은 경우에는 가시성을 높이기 위해서라도 후염색을 하는 것이 좋다)

2.2.3.4.2. 전기영동

TAE 완충용액을 채운 전기영동조에 겔을 세팅한다. PCR 증폭반응액 7.5μL와 적당량의 겔 로딩 완충용액을 혼합한 후 겔의 웰에 주입한다. 웰에 주입하는 시간이 길어지면 DNA가 확산되어 선명한 결과를 얻을 수 없게 되므로 주의한다. 그 다음, 100V 정격전압으로 전기영동을 실시하여 겔 로딩 완충용액에 포함된 BPB가 겔의 2/3 정도까지 진행되면 전기영동

을 종료한다.

2.2.3.4.3. 겔의 염색(후염색)

전염색을 실시한 경우에는 본 항의 조작은 필요없다.

겔이 충분히 잠길 만큼의 TAE 완충용액이 들어있는 용기에 영동 후의 겔을 옮겨 넣는다. 그 다음, 완충용액 100mL당 5 μ L의 브로민화 에티듐 용액(10mg/mL)을 첨가하여 용기를 진탕기에 올리고 가볍게 진동시키면서 20분 정도 염색한다. 그 후 TAE 완충용액만 들어있는 용기에 염색한 겔을 옮기고 20분 정도 가볍게 진동시키면서 탈염을 실시한다.

2.2.3.4.4. 겔 이미지 분석

겔 이미지 분석장치 내의 스테이지에 식품포장용 랩*을 깔고, 그 위에 전기영동 및 염색 조작을 완료한 겔을 올려 자외선(312nm)을 조사한다. 겔 이미지 분석장치의 화면에서 전기영동 패턴을 확인한다. DNA 분자량 표준마커와 비교하여 목표로 하는 밴드의 유무를 판정한다. 공시험 반응액에서 대응하는 PCR 증폭밴드가 검출된 경우에는 DNA 추출조작 이후의 결과를 무효로 하고 실험을 다시 실시한다. 영동 결과는 화상데이터로 보존해둔다.

* 식품포장용 랩

폴리염화비닐리덴 필름이 아니면 자외선을 흡수해버려 이미지를 얻을 수 없는 경우가 있으므로 주의한다.

2.2.3.5. 결과 판정

2.2.3.5.1. 땅콩을 대상으로 하는 PCR 검사 결과의 판정

1개의 조제시료에서 2점을 병행추출한 DNA를 규정농도로 조제한 후 주형DNA로 이용해서 PCR법을 실시한다. 우선 첫 PCR 증폭은 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 실시한다. 그 결과 DNA 시료액 2점 모두에서 124bp의 PCR 증폭밴드가 검출된 경우에는 (아래 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 판정의 예 시료번호 1) 두 시료액 모두에서 PCR 증폭에 필요한 품질을 갖춘 DNA가 추출되었다고 판단하고, 다음으로 땅콩 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 각 시료액으로 PCR 증폭을 실시한다. 땅콩 검출용 프라이머 쌍을 사용한 두번째 PCR 증폭의 결과, DNA 시료액 2점 모두 또는 어느 하나에서 95bp의 PCR 증폭밴드가 검출되면 본 검사 대상 검체는 땅콩 양성으로 판정한다(아래 검출용 프라이머 쌍 판정의 예 시료번호 1 및 2). 또한 첫 번째로 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 PCR 증폭을 실시한 결과 DNA 시료액 2점 중 어느 하나에서 PCR 증폭밴드가 검출되지 않은 경우(아래 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 판정의 예 시료번호 2 및 3)에는 해당 시료액을 사용한 검사를 중단하고 PCR 증폭밴드를 얻은 시료액만을 주형으로 하여 검출용 프라이머 쌍을 사용한 두 번째 PCR 증폭을 실시한다. 그 결과 95bp의 PCR 증폭밴드가 검출되면 본 검사 대상 검체는 땅콩 양성으로 판정한다.

또한, 아래의 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 판정의 예 시료번호 4와 같이 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용한 첫 PCR 증폭의 결과에서 DNA 시료액 2점 모두 PCR 증폭

밴드를 얻지 못한 경우에는 PCR 증폭에 필요한 품질의 DNA가 추출되지 않았다고 판단하고 2.2.3.2.에 기술된 먼저 사용한 DNA 추출법이 아닌 다른 DNA추출법을 시도한다. 2.2.3.2.에 기술된 3종의 DNA추출법을 이용해도 동일한 결과가 얻어지는 경우에는 해당 검사 대상 검체로부터 DNA를 추출할 수 없으며 PCR법에 의한 검출이 불가능한 것으로 판단한다. 판정의 예는 다음과 같다.

식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 판정의 예

	시료번호	1	2	3	4
추출 1		+	+	-	-
추출 2		+	-	+	-
		사례 1	사례 2		사례 3

+: 증폭밴드 검출, -: 증폭밴드 미검출

사례 1 : DNA 시료액 2점에 대해 검출용 프라이머 쌍을 사용한 PCR 증폭을 실시한다.

사례 2 : 증폭밴드를 얻은 DNA 시료액에만 검출용 프라이머 쌍을 사용한 PCR 증폭을 실시한다.

사례 3 : 본 방법으로는 DNA추출이 어렵다고 판단하여 DNA추출방법을 최적화한다.

3종의 DNA추출법을 모두 시도해도 결과가 동일할 경우에는 해당 검사 대상 검체로부터 DNA를 추출할 수 없으며 PCR법에 의한 검출이 불가능하다고 판단한다.

검출용 프라이머 쌍 판정의 예

	시료번호	1	2	3
추출 1		+	+	-
추출 2		+	-	-
판정		양성	양성	음성

+: 증폭밴드 검출, -: 증폭밴드 미검출

2.2.3.2.에 기술된 것과 같이 검사 대상 검체에 가장 적합한 추출법을 선택하지 않은 경우에는 양, 질 모두 PCR의 주형이 될 수 있는 DNA를 추출하기 어렵다. 중합효소연쇄반응법에 사용하는 DNA시료액은 최적의 추출법으로 추출, 정제되어 원칙적으로 2.2.3.2.4.에 제시된 기준을 충족한 것으로 한다.

2.2.3.5.2. 메밀을 대상으로 하는 PCR 검사 결과의 판정

식물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용한 레인에서 124bp의 PCR 증폭밴드가 검출되고 메밀 검출용 프라이머 쌍을 사용한 레인에서 127bp의 PCR 증폭밴드가 검출되면 본 검사 대상 검체는 메밀 양성으로 판정한다. 결과 판정 절차, 판정의 예 및 주의사항은 2.2.3.5.1의 땅콩을 대상으로 하는 검사 결과의 판정과 동일하다.

2.2.3.5.3. 밀을 대상으로 하는 PCR 검사 결과의 판정

식물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용한 레인에서 124bp의 PCR 증폭밴드가 검출되고

밀 검출용 프라이머 쌍을 사용한 레인에서 141bp의 PCR 증폭밴드가 검출되면 본 검사 대상 검체는 밀 양성으로 판정한다. 결과 판정 절차, 판정의 예 및 주의사항은 2.2.3.5.1의 땅콩을 대상으로 하는 검사 결과의 판정과 동일하다.

2.2.3.5.4. 새우를 대상으로 하는 PCR 검사 결과의 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용한 레인에서 124bp 또는 370-470bp의 PCR 증폭밴드가 검출되고 새우 검출용 프라이머 쌍을 사용한 레인에서 187bp의 PCR 증폭밴드가 검출되면 본 검사 대상 검체는 새우 양성으로 판정한다. 단, 새우 검출용 프라이머 쌍을 사용한 PCR 증폭반응에서는 현재까지의 검토 결과 참게(*Eriocheir sinensis*), 던지니스게(*Metacarcinus magister*), 일본거미게(*Macrocheira kaempferi*), 홍게(*Chionoecetes japonicus*), West African geryon(*Chaceon maritae*), 꽃게(*Portunus trituberculatus*)가 위양성을 나타내는 경우가 있음이 확인되었다. 따라서 이렇게 얻어진 PCR 증폭 산물이 새우에서 유래한 것인지 이러한 게에서 유래한 것인지 판단할 수 없는 경우에는 2.2.3.3.5.의 방법대로 PCR 증폭 산물의 제한효소소화를 실시하여, 새우 유래 PCR 증폭 산물의 효소소화단편(149bp)을 확인한다. 결과 판정 절차, 판정의 예, 주의사항은 2.2.3.5.1의 땅콩을 대상으로 하는 검사 결과의 판정과 동일하다.

* 제한효소소화

제한효소소화 처리 후에도 참게(*Eriocheir sinensis*)는 위양성을 나타낸다는 것이 확인되었다.

2.2.3.5.5. 게를 대상으로 하는 PCR 검사 결과의 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용한 레인에서 124bp 또는 370-470bp의 PCR 증폭밴드가 검출되고 게 검출용 프라이머 쌍을 사용한 레인에서 62bp의 PCR 증폭밴드가 검출되면 본 검사 대상 검체는 게 양성으로 판정한다*. 결과 판정 절차, 판정의 예 및 주의사항은 2.2.3.5.1의 땅콩을 대상으로 하는 검사 결과의 판정과 동일하다.

* 위양성을 나타내는 게의 종류

갯가재는 위양성을 나타내는 것이 확인되었다. 그 외에도 일부 새우에서 위양성을 나타내는 경우가 있음이 확인되었다.

2.2.4. Real-time PCR법

식품에 관한 PCR법인 DNA추출·정제법(2.2.3.2)에 따라 DNA를 추출하여 얻은 DNA시료액으로 다음과 같은 정성적 Real-time PCR을 실시한다.

DNA추출은 1개의 조제시료당 2개를 병행 실시하고, 이후 Real-time PCR 증폭이 확인되기까지의 모든 조작은 이 2개에 대해서 독립적으로 병행 실시한다.

2.2.4. 1. 시료조제법

PCR법의 시료조제법(2.2.3.1)에 따른다.

2.2.4.2. DNA추출·정제법

PCR법의 DNA추출법(2.2.3.2)에 따른다.

2.2.4.3. 정성적 Real-time PCR법

정성적 Real-time PCR법은 PCR 증폭을 Real-time으로 모니터링하는 방법으로 몇 가지 기법이 있으나 여기서는 프로브법을 사용한다. 프로브법에서는 5' 말단을 형광물질로, 3' 말단을 소거제로 modification한 올리고뉴클레오타이드(프로브)를 PCR의 반응계에 첨가한다. 프로브는 결합단계에서 표적 DNA배열에 특이적으로 교잡되면서 신장반응 시에 분해된 소거제에 의한 형광억제가 해소됨으로써 형광물질에서 유래하는 형광빛을 발하게 된다. 이 형광빛을 전용장치를 통해 검출함으로써 PCR 증폭을 Real-time으로 모니터링하여 그 결과를 분석한다. 유의점은 정성적 PCR법(2.2.3.3)과 동일하다.

2.2.4.3.1. PCR 증폭 Real-time 측정

정성적 Real-time PCR법으로 검출 가능한 특정 원재료는 밀, 메밀, 땅콩, 호두, 캐슈너트의 5종이며 각각에 대한 Real-time PCR 증폭의 조건이 다르다. 2.2.4.3.2부터 2.2.4.3.6에 기재된 방법 중 검사 대상으로 하는 특정 원재료 중에 맞는 방법을 사용하여 검사를 실시한다. 각 검사 모두 1개의 조제시료로부터 2점 병행 추출된 DNA를 각각 규정농도로 조제한 후 Real-time PCR법의 주형DNA로 사용한다. 우선 Real-time PCR의 증폭 곡선을 식물 DNA 검출용 Real-time PCR 프라이머 쌍과 프로브^{*1*3*4} 또는 동물 DNA 검출용 Real-time PCR 프라이머 쌍과 프로브^{*2*3*5}를 이용하여 취득하거나 혹은 2.2.3.3.1.에 따라 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 실시하고 그 결과를 2.2.3.5.에 기재된 판정의 예와 대조하여 판정한 후, 그 판정에 준하여 검사 대상 특정 원재료의 Real-time PCR 증폭을 실시한다.

*1 식물 DNA 검출용 Real-time PCR 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.

식물 DNA 검출용 Real-time PCR 프라이머 쌍(증폭 길이 124 bp)

5' 프라이머(CP03-5') : 5'-CGGACGAGAATAAAGATAGAGT-3'

3' 프라이머(CP03-3') : 5'-TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA-3'

프로브(CP03-probe) : 5'-FAM-AGGAAAATCCGT-MGB-3'

*2 동물 DNA 검출용 Real-time PCR 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.

동물 DNA 검출용 프라이머 쌍(증폭 길이 370-470 bp)

5' 프라이머(AN-5') :

AN1-5': 5'-TGACCGTGCGAAGGTAGC-3'

AN2-5': 5'-TAACTGTGCTAAGGTAGC-3'

AN1-5' 및 AN2-5'를 1:1의 비율로 혼합하여 사용한다.

3' 프라이머(AN-3') : 5'-CTTAATTCAACATCGAGGTC-3'

프로브(AN-probe) : 5'- FAM-CGCTGTTATCCC-MGB-3'

*3 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍의 성질 및 유의점은 정성 PCR법(2.2.3.3.1.)과 동일하다.

*4 식물 DNA 검출용 Real-time PCR 반응 조건은 다음과 같다.

반응액은 반응 시료관에 Real-time PCR 시약*6 10 µL, 5' 및 3' 프라이머(모두 12.5 µM) 각각 0.8 µL, 프로브(10 µM) 0.4 µL 및 물 5.5 µL를 포함한 마스터 믹스(아래 표 참조)에, 20 ng/µL로 조제한 DNA 시료액*7 2.5 µL(DNA로서 50 ng)를 첨가하여, 총량을 20 µL로 만든다. DNA 시료액 대신 양성 대조군 용액*8 2.5 µL를 첨가한 것을 조제하여, 결과 판정 시 기준으로 삼는 것이 바람직하다. PCR의 블랭크 반응액으로서 반드시 DNA 시료액을 첨가하지 않은 것도 동시에 조제한다. 다음으로 해당 반응 시료관을 Real-time PCR 증폭 장치*9에 장착한다. 반응 조건은 다음과 같다. 95℃에서 15분간 유지하여 반응을 시작한 후, 95℃ 15초, 55℃ 1분을 1사이클로 하여, 45사이클의 Real-time PCR 증폭을 수행한다. Reporter, Quencher 입력이 필요한 장치의 경우, Reporter는 FAM으로, Quencher는 NFQ-MGB(또는 None)로 설정한다.

마스터믹스 조성(식물)

시약	반응액 1개당 필요량(µL)
Real-time PCR시약*6	10
5'프라이머(12.5µM)	0.8
3'프라이머(12.5µM)	0.8
프로브(10µM)	0.4
물	5.5
합계	17.5

*5 동물 DNA 검출용 Real-time PCR 반응 조건은 다음과 같다.

반응액은 반응 시료관에 Real-time PCR 시약*6 10 µL, 5'프라이머 AN1 및 2(12.5 µM) 각각 0.4 µL, 3'프라이머(12.5 µM) 0.8 µL, 프로브(10 µM) 0.4 µL 및 물 5.5 µL를 포함한 마스터 믹스(아래 표 참조)에, 20 ng/µL로 조제한 DNA 시료액*7 2.5 µL(DNA로서 50 ng)를 첨가하여, 총량을 20 µL로 만든다. DNA 시료액 대신 양성 대조군 용액*8 2.5 µL를 첨가한 것을 조제하여, 결과 판정 시 기준으로 삼는 것이 바람직하다. PCR의 블랭크 반응액으로서, 반드시 DNA 시료액을 첨가하지 않은 것도 동시에 조제한다. 다음으로 그 반응 시료관을 Real-time PCR 증폭 장치*9에 세팅한다. 반응 조건은 다음과 같다. 95℃에서 15분간 유지하여 반응을 시작한 후, 95℃ 15초, 55℃ 15초, 60℃ 1분을 1사이클로 하여, 45사이클의 Real-time PCR 증폭을 수행한다. Reporter, Quencher 입력이 필요한 장치의 경우, Reporter는 FAM으로, Quencher는 NFQ-MGB(또는 None)로 설정한다.

마스터믹스 조성(동물)

시약	반응액 1개당 필요량(μL)
Real-time PCR시약*6	10
5'프라이머 AN1-5'(12.5μM)	0.4
5'프라이머 AN2-5'(12.5μM)	0.4
3'프라이머(12.5μM)	0.8
프로브(10μM)	0.4
물	5.5
합계	17.5

*6 Real-time PCR 시약은 QuantiTect Probe PCR Master Mix(Qiagen사 제조) 또는 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*7 원칙적으로 DNA 시료액은 20 ng/μL의 농도로 조제하지만, 검사 대상 검체에 따라 DNA 추출 효율이 좋지 않아 그보다 낮은 농도로만 조제할 수 있는 경우가 있을 수 있다. 그러한 경우에는 원칙에 가장 가까운 최대 농도로 조제하여 DNA 시료액으로 삼는다.

*8 양성 대조군 용액은 DNA 양으로 0.25 fg(50 카피 상당)의 '식물 검출용 양성 대조군 템플릿' 또는 '동물 검출용 양성 대조군 템플릿'(오리엔탈 효모공업사 제조), 혹은 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, 양성 대조군 용액의 분석 결과는 DNA 시료액 속에 식물 유래 DNA 또는 동물 유래 DNA가 포함되어 있는지 확인할 때, 판정 기준이 되는 규정값으로 사용할 수 있다.

*9 Real-time PCR 증폭 장치는 상기 온도 조건을 달성할 수 있는 장치를 사용할 것. 또한, 새롭게 조건을 설정할 때에는 형광 데이터의 취득이 적절하게 설정되어 있는지 확인할 것.

2.2.4.3.2. 땅콩 검지를 위한 PCR 증폭 Real-time 측정

Real-time PCR용 반응시료관에 다음과 같이 반응액을 조제한다. 반응액은 Real-time PCR 시약*1 12.5μL, 5' 및 3'프라이머*2(모두 50μ M) 각각 0.2μL, 프로브*2(10μM) 0.25μL, 및 물 9.35μL을 포함하는 마스터믹스(아래 마스터믹스 조성(땅콩) 참조)에 20 ng/μL로 조제한 DNA시료액*3 2.5μL(DNA로는 50 ng)를 첨가하여 전체 양을 25μL로 한다. DNA시료액 대신 기준 플라스미드용액*4 2.5μL, 또는 고농도 플라스미드용액*4 2.5μL를 첨가한 것에 대해서도 각각 2점씩 병행 측정할 분량을 동시에 조제한다. PCR의 공시험반응액으로 DNA시료액을 첨가하지 않은 것도 반드시 동시에 조제한다. 그 다음, 반응시료관을 Real-time PCR 증폭장치*5에 세팅한다. 반응조건은 다음과 같다. 95℃에 15분간 두어 반응이 시작되도록 한 후 95℃에서 0.5분, 68℃에서 1분을 1사이클로 하여 기종에 따라 38 또는 42사이클*6의 Real-time PCR 증폭을 실시한다. Reporter, Quencher의 입력이 필요한 장치의 경우에는 Reporter는 FAM으로, Quencher는 NFQ-MGB(또는 None)으로 설정한다.

마스터믹스 조성(땅콩)

시약	반응액 1개당 필요량(μL)
Real-time PCR시약*1	12.5
5'프라이머(50μM)*2	0.2
3'프라이머(50μM)*2	0.2
프로브(10μM)*2	0.25
물	9.35
합계	22.5

- *1 Real-time PCR 시약은 QuantiTect Probe PCR Master Mix(QIAGEN사) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.
- *2 땅콩 검출용 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.
- 5'프라이머(AI2-F): 5'-TTGGTTCAAAGAGACGGGCTC-3'
- 3'프라이머(AI2-R): 5'-CACGAGGGTTGTTCTCGACC-3'
- 프로브(AI2-probe): 5'-FAM-ACCGCGGCAGATGG-MGB-3'
- *3 원칙적으로 DNA시료액은 20ng/μL의 농도로 조제하지만 검사 대상 검체에 따라서는 DNA추출 효율이 낮아 그 이하의 농도로 조제할 수밖에 없는 경우가 있을 것으로 추정된다. 그와 같은 경우에는 원칙에 가장 가까운 최대 농도로 조제하여 DNA시료액으로 사용한다.
- *4 플라스미드용액은 '정성적 Real-time PCR 밀, 메밀, 땅콩, 호두 검출용 플라스미드 세트'(FASMAC사 제조) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 기준 플라스미드용액은 시료의 양성/음성을 판정하기 위하여, 고농도 플라스미드용액은 본 방법에 따른 Real-time PCR이 타당하게 실시되었는지 확인하기 위하여 사용한다.
- *5 Real-time PCR 증폭장치는 상기 온도조건을 달성할 수 있는 장치를 사용할 것.
- *6 ABI 7900HT(Thermo Fisher Scientific사 제조)와 마찬가지로 분석 시에 임의의 Threshold Line을 설정할 수 있는 기종은 38사이클, 그 밖의 기종은 42사이클로 설정한다.

2.2.4.3.3. 메밀 검지를 위한 PCR 증폭 Real-time 측정

2.2.4.3.2.에 따라 실시한다. 단, 5'프라이머와 3'프라이머의 농도는 모두 25μM이다. 또한 5'프라이머, 3'프라이머 및 프로브*는 메밀 검출용 프라이머 쌍 및 프로브이다.

* 메밀 검출용 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.

5'프라이머(Fago-453): 5'-CGCCAAGGACCACGAACAGAAG-3'

3'프라이머(Fago-261): 5'-CGTTGCCGAGAGTCGTTCTGTTT-3'

프로브(Fago-probe): 5'-FAM-CGGGACGCGCTTC-MGB-3'

2.2.4.3.4. 밀 검지를 위한 PCR 증폭 Real-time 측정

2.2.4.3.2.에 따라 실시한다. 5'프라이머와 3'프라이머의 농도는 모두 50μM이다. 또한 5'프라이머, 3'프라이머 및 프로브*는 밀 검출용 프라이머 쌍 및 프로브이다.

* 밀 검출용 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.

5'프라이머(Tri-F): 5'-CATGGTGGGCGTCCTC-3'

3'프라이머(Tri-R):

Tri-R1: 5'-AAAGGCCATAATGCCAGCTG-3'

Tri-R2: 5'-TGAGGCCGTCATGCCGGCTG-3'

Tri-R3: 5'-TGAGGCCATAATGTCCGGCTG-3'

Tri-R1, Tri-R2, Tri-R3를 2:1:1의 비율로 혼합하여 사용한다.

프로브(Tri-probe): 5'-FAM-CGGATGCACTGCITTGATAAAG-MGB-3'

프로브 배열 중 I는 이노신이다.

2.2.4.3.5. 호두 검지를 위한 PCR 증폭 Real-time 측정

2.2.4.3.5.1. 호두-H법

2.2.4.3.2.에 따라 실시한다. 단, 5'프라이머와 3'프라이머의 농도는 모두 25μM이다. 또한 5'프라이머, 3'프라이머 및 프로브*는 호두 검출용 프라이머 쌍 및 프로브이다.

* H법의 호두 검출용 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.

5'프라이머(JI2F4): 5'-CCACGACAATCGGTGGTTGAG-3'

3'프라이머(JI2R2): 5'-GTCGAGGAGCACCTTCACA-3'

프로브(JI2P): 5'-FAM-ACACACGACGGGTCACGAGG-MGB-3'

2.2.4.3.5.2. 호두-N법

Real-time PCR용 반응시료관에 다음과 같이 반응액을 조제한다. 반응액은 Real-time PCR시약*¹ 10μL, 5' 및 3'프라이머*²(모두 10μM) 각각 0.8μL, 프로브*²(10μM) 0.4μL 및 물 5.5μL을 포함하는 마스터믹스(아래 표 참조)에 20 ng/μL로 조제한 DNA시료액*³ 2.5μL(DNA로는 50 ng)를 첨가하여 전체 양을 20μL로 만든다. PCR의 공시험 반응액으로 DNA시료액을 첨가하지 않은 것도 반드시 동시에 조제한다. 다음으로 반응시료관을 Real-time PCR 증폭장치*⁴에 세팅한다. 반응조건은 다음과 같다. 95℃에 15분간 두어 반응이 시작되도록 한 후 94℃에서 15초, 60℃에서 1분을 1사이클로 하여 35사이클의 Real-time PCR 증폭을 실시한다. Reporter, Quencher의 입력이 필요한 장치의 경우에는 Reporter를 FAM으로, Quencher는 NFQ-MG B(또는 None)로 설정한다.

마스터믹스 조성(호두-N법)

시약	반응액 1개당 필요량(μL)
Real-time PCR시약* ¹	10
5'프라이머(10μM)* ²	0.8
3'프라이머(10μM)* ²	0.8

프로브(10 μ M) ^{*2}	0.4
물	5.5
합계	17.5

- *1 Real-time PCR시약은 QuantiTect Probe PCR Master Mix(QIAGEN사 제조) 또는 그와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.
- *2 N법의 호두 검출용 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.
 5'프라이머(JUGr-F): 5'-AAACGGTTGGGAGGGCACGT-3'
 3'프라이머(JUGr-R): 5'-CGCCCGTGGTTACTCCTTGTTTA-3'
 프로브(JUGr-P): 5'-FAM-TTGGTCAATCTTCTCGTTCC-MGB-3'
- *3 원칙적으로 DNA시료액은 20 ng/ μ L의 농도로 조제하지만, 검사 대상 검체에 따라서는 DNA 추출 효율이 낮아 그 이하의 농도로밖에 조제할 수 없는 경우가 있을 것으로 추정된다. 그와 같은 경우에는 원칙에 가장 가까운 최대 농도로 조제하여 DNA 시료액으로 사용한다.
- *4 Real-time PCR 증폭장치는 상기 온도조건을 달성할 수 있는 장치를 사용할 것.

2.2.4.3.6. 캐슈너트 검지를 위한 PCR 증폭 Real-time 측정

2.2.4.3.6.1. 캐슈너트-H법

- 2.2.4.3.2.에 따라 실시한다. 단, 5'프라이머와 3'프라이머의 농도는 모두 25 μ M이다. 아울러, 5'프라이머, 3'프라이머 및 프로브*는 캐슈너트 검출용 프라이머 쌍 및 프로브이다.
- * H법의 캐슈너트 검출용 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.

5'프라이머(AoI1F7): 5'- CTCCCGTCGCCCCGTG-3'
 3'프라이머(AoI1R4): 5'- CTGACAATGAAAGGAGGCAACGCT-3'
 프로브(AoI1P): 5'-FAM- CCGTGCGCGTGCGGGA-MGB-3'

2.2.4.3.6.2. 캐슈너트-N법

- 2.2.4.3.5.2.에 따라 실시한다. 단, 5'프라이머, 3'프라이머 및 프로브*는 캐슈너트 검출용 프라이머 쌍 및 프로브이다.
- * N법의 캐슈너트 검출용 프라이머 쌍 및 프로브는 다음과 같다.

5'프라이머(ANAr-F): 5'- GAGTCGCGCCAAGGAATCTTAC-3'
 3'프라이머(ANAr-R): 5'- CGTTGCCGAGAGTCGTCAC-3'
 프로브(ANAr-P): 5'-FAM- CCGTGCTCGGTGCG-MGB-3'

2.2.4.4. 결과의 해석

2.2.4.4.1. Real-time PCR 측정 결과의 해석

Real-time PCR 장치에 의하여 얻어진 형광신호를 해석하여 각 DNA 시료액에 대해 Real-time PCR 증폭 유무를 판단한다. Threshold Line을 사용하는 기종(ABI 7500 등)의 경우에는 Analysis Settings에서 Threshold Line 및 Baseline이 Auto로 설정되어 있는 것을

확인한 후, 모든 Cq값을 산출한다. 기타 기종(Roche LightCycler 96 등)의 경우에는 절대 정량용 해석 툴을 사용하여 장치에 초기 설정된 해석조건으로 모든 반응시료관의 Cq값을 산출한다.

또한, 고감도 ROX 장치 등의 사용으로 ROX 레벨이 높은 경우에는 노멀라이저로서의 ROX 채널 보정을 해제하고 Cq값을 산출한다.

식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 사용한 Real-time PCR의 결과를 2.2.3.5에 기재된 판정 예에 비추어 판정할 때, 먼저 블랭크 반응액에서 Cq값이 규정값*보다 큰 것을 확인한 후, DNA 시료액의 측정 결과를 확인한다. Cq값이 규정값 이하인 시료액은 표적 배열이 Real-time PCR로 증폭되었다고 판단한다.

* 규정값

식물 DNA를 검출하는 경우: 36, 또는 양성 대조군 용액의 분석 결과(평균값)와 비교하여 둘 중 더 작은 값을 선택한다.

동물 DNA를 검출하는 경우: 38, 또는 양성 대조군 용액의 분석 결과(평균값)와 비교하여 둘 중 더 작은 값을 선택한다.

2.2.4.4.2. 땅콩 검지를 위한 Real-time PCR 측정 결과의 해석

Real-time PCR 장치로 얻은 형광 신호를 분석하여, 각 DNA 시료액에 대해 Real-time PCR 증폭 유무를 판단한다. 분석 시 임의의 Threshold Line을 설정할 수 있는 기종(ABI 7900HT 등)의 경우, 고농도 플라스미드 용액을 Real-time PCR 증폭한 반응 시료관만으로 Analysis Settings에서 Threshold Line 및 Baseline이 Auto 설정되어 있는지 확인한 후, Cq값(Ct값)을 산출한다. 얻은 Threshold Line 값을 소수점 이하 7번째 자리에서 반올림하여 6자리까지 기록한다. 다음으로 Real-time PCR 증폭된 모든 반응 시료관에 대해, 기록한 Threshold Line 값을 이용하여 Cq값을 산출한다. 상기 해석을 수행할 수 없는 경우, 또는 기타 기종일 경우에는 절대 정량용 분석 도구를 통해 장치의 초기 설정 분석 조건에서 모든 반응 시료관에 대해 Cq값을 산출한다. DNA 시료액에서 산출된 Cq값이 2점 병렬로 측정한 기준 플라스미드 용액의 평균 Cq값보다 작을 경우, 표적이 되는 배열이 Real-time PCR 증폭되었다고 판단한다. 또한, 2점 병렬로 측정한 기준 플라스미드 용액의 평균 Cq값에서 2점 병렬로 측정한 고농도 플라스미드 용액의 평균 Cq값을 뺀 값이 4.6~6.6을 벗어난 경우, 본법에 의한 Real-time PCR 증폭이 타당하게 수행되지 않았다고 판단하여 Real-time PCR 증폭을 다시 수행한다. 또한, 블랭크 반응액에서 표적으로 삼는 배열이 Real-time PCR 증폭된 것으로 판단된 경우, 실험 환경으로부터의 오염이 있었다고 판단하여 Real-time PCR 증폭을 다시 수행한다.

2.2.4.4.3. 메밀 검지를 위한 Real-time PCR 측정 결과의 해석

2.2.4.4.2.에 따라 실시한다.

2.2.4.4.4. 밀 검지를 위한 Real-time PCR 측정 결과의 해석

2.2.4.4.2.에 따라 실시한다.

2.2.4.4.5. 호두 검지를 위한 Real-time PCR 측정 결과의 해석

2.2.4.4.5.1. 호두-H법

2.2.4.4.2.에 따라 실시한다.

2.2.4.4.5.2. 호두-N법

Real-time PCR 장치로 얻은 형광 신호를 분석하여, 각 DNA 시료액에 대해 Real-time PCR 증폭 유무를 판단한다. Threshold Line을 사용하는 기종(ABI 7500 등)의 경우, Analysis Settings에서 Threshold Line 및 Baseline이 Auto로 설정되어 있는지 확인한 후, 모든 Cq값을 산출한다. 그 외 기종(Roche LightCycler 96 등)의 경우에는 절대 정량용 분석 도구를 통해 장치 초기 설정의 분석 조건에서 모든 반응 시료관에 대해 Cq값을 산출한다. 블랭크 반응액에서 Cq값이 얻어지지 않았음을 확인한 후, DNA 시료액의 측정 결과를 확인한다. Cq값이 얻어진 시료액은 표적이 되는 배열이 Real-time PCR 증폭되었다고 판단한다.

2.2.4.4.6. 캐슈너트 검지를 위한 Real-time PCR 측정 결과의 해석

2.2.4.4.6.1. 캐슈너트-H법

2.2.4.4.2.에 따라 실시한다.

2.2.4.4.6.2. 캐슈너트-N법

2.2.4.4.5.2.에 따라 실시한다.

2.2.4.5. 결과 판정

2.2.4.5.1. 땅콩을 대상으로 하는 Real-time PCR 검사 결과의 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 Real-time PCR에서 Cq값이 규정치 이하이며 DNA가 지수 함수적으로 증폭되는 적절한 증폭 곡선이 얻어졌거나, 식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭 반응액의 전기 영동에서 124 bp 또는 370-470 bp의 PCR 증폭 밴드가 검출되고 땅콩 검지를 위한 Real-time PCR법에서 표적이 되는 배열이 Real-time PCR 증폭되었다고 판단되면, 본 검사 대상 검체는 땅콩 양성으로 판정한다.

또한, 결과 판정 순서, 판정 예 및 주의사항은 2.2.3.5.1.에 기재된 땅콩을 대상으로 한 검사 결과의 판정과 동일하다.

2.2.4.5.2. 메밀을 대상으로 하는 Real-time PCR 검사 결과의 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 Real-time PCR에서 Cq값이 규정치 이하이며 DNA가 지수 함수적으로 증폭되는 적절한 증폭 곡선이 얻어졌거나, 식물 또는

동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭 반응액의 전기 영동에서 124 bp 또는 370-470 bp의 PCR 증폭 밴드가 검출되고 메밀 검지를 위한 Real-time PCR법에서 표적으로 하는 배열에 Real-time PCR 증폭이 일어났다고 판단되면, 본 검사 대상 검체는 메밀 양성으로 판정한다.

또한 결과 판정 순서, 판정의 예 및 주의사항은 2.2.3.5.1에 기재된 땅콩을 대상으로 한 검사 결과의 판정과 동일하다.

2.2.4.5.3. 밀을 대상으로 하는 Real-time PCR 검사 결과의 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 Real-time PCR에서 Cq값이 규정치 이하이며 DNA가 지수 함수적으로 증폭되는 적절한 증폭 곡선이 얻어졌거나, 식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭 반응액의 전기 영동에서 124 bp 또는 370-470 bp의 PCR 증폭 밴드가 검출되고 밀 검지를 위한 Real-time PCR법에서 표적으로 하는 배열에 Real-time PCR 증폭이 일어났다고 판단되면, 본 검사 대상 검체는 밀 양성으로 판정한다.

또한 결과 판정 절차, 판정의 예 및 주의사항은 2.2.3.5.1에 기재된 땅콩을 대상으로 하는 검사 결과의 판정과 동일하다.

2.2.4.5.4. 호두를 대상으로 하는 Real-time PCR 검사 결과의 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 Real-time PCR에서 Cq값이 규정치 이하이며 DNA가 지수 함수적으로 증폭되는 적절한 증폭 곡선이 얻어졌거나, 식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭 반응액의 전기 영동에서 124 bp 또는 370-470 bp의 PCR 증폭 밴드가 검출되고 호두 검지를 위한 Real-time PCR법에서 표적으로 하는 배열에 Real-time PCR 증폭이 일어났다고 판단되면, 본 검사 대상 검체는 호두 양성으로 판정한다.

또한 결과 판정 절차, 판정의 예 및 주의사항은 2.2.3.5.1에 기재된 땅콩을 대상으로 하는 검사 결과의 판정과 동일하다.

2.2.4.5.5. 캐슈너트를 대상으로 하는 Real-time PCR 검사 결과의 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 Real-time PCR에서 Cq값이 규정치 이하이며 DNA가 지수 함수적으로 증폭되는 적절한 증폭 곡선이 얻어졌거나, 식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭 반응액의 전기 영동에서 124 bp 또는 370-470 bp의 PCR 증폭 밴드가 검출되고 캐슈너트 검지를 위한 Real-time PCR법에서 표적으로 하는 배열에 Real-time PCR 증폭이 일어났다고 판단되면 본 검사 대상 검체는 캐슈너트 양성으로 판정한다.

또한 결과 판정 절차, 판정의 예 및 주의사항은 2.2.3.5.1에 기재된 땅콩을 대상으로 하는 검사 결과의 판정과 동일하다.

2.2.5. PCR-핵산크로마토그래피

식품에 관한 PCR법인 DNA추출 정제법(2.2.3.2)에 따라 DNA를 추출하여 얻어진 DNA시료액을 이용하여 다음과 같은 PCR-핵산크로마토그래피를 실시한다. 또한 DNA추출은 1개 조제시료 당 2개를 병행 실시하고, 이후 PCR 증폭이 확인되기까지의 모든 조작은 그 2개에 대해서 독립 병행 실시한다.

2.2.5.1. 시료조제법

PCR법의 시료조제법(2.2.3.1)에 따른다.

2.2.5.2. DNA추출 정제법

PCR법의 DNA추출 정제법(2.2.3.2)에 따른다.

2.2.5.3. 정성 PCR-핵산크로마토그래피

PCR-핵산크로마토그래피는 태그가 붙은 프라이머를 사용해 PCR 증폭을 실시하고 증폭 산물을 전용 검사지에 전개시켜(핵산크로마토그래피), 밴드의 유무를 통해 표적 DNA의 유무를 육안으로 판정하는 방법이다. 유의점은 정성적 PCR법(2.2.3.3)과 동일하다.

2.2.5.3.1. 핵산크로마토그래피를 위한 PCR 증폭

PCR-핵산크로마토그래피를 통해 검지 가능한 특정 원재료는 호두 및 캐슈너트의 2종이다. 각각에 있어 PCR 증폭 조건이 다르다. 2.2.5.3.2에서 2.2.5.3.3의 방법 중, 검사 대상이 되는 특정 원재료 중에 따른 방법을 이용하여 검사를 실시한다. 또한 각 검사 모두 조제시료 1개에서 2점 병행 추출된 DNA 각각을 규정 농도로 조제한 후, 핵산크로마토그래피의 PCR 증폭 주형 DNA로 사용한다. 또한 2.2.3.3.1.에 따라 식물 DNA 검출용 프라이머 쌍 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 실시하고 그 결과*를 2.2.3.5.항에 기재된 판정의 예와 대조하여 판정한 후, 그 판정에 준하여 PCR-핵산크로마토그래피를 특정 원재료 검출용 프라이머 쌍을 이용하여 실시한다.

* 2.2.4.3.1항에 따라 실시한 식물 DNA 또는 동물 DNA 검출 Real-time PCR의 결과로 치환하여 판단할 수도 있다.

2.2.5.3.2. 핵산 크로마토그래피를 이용한 호두 검지를 위한 PCR 증폭

PCR용 반응 시료관에 반응액을 다음과 같이 조제한다. 반응액은 PCR 시약^{*1} 10 μ L, 5' 및 3'프라이머^{*2}(모두 10 μ M) 각각 0.6 μ L, 그리고 물 6.3 μ L에, 20 ng/ μ L로 조제한 DNA 시료액^{*3} 2.5 μ L(DNA로서 50 ng)를 첨가하여 총량을 20 μ L로 만든다. PCR의 블랭크 반응액으로서, 반드시 DNA 시료액을 첨가하지 않은 것도 동시에 조제한다. 다음으로 그 반응 시료관을 PCR 증폭 장치^{*4}에 세팅한다. 반응 조건은 다음과 같다. 95℃에서 5분간 유지하여 반응을 시작시킨 후, 94℃ 30초, 67℃ 30초, 72℃ 30초를 1사이클로 하여, 35사이클의 PCR 증폭을 수행한다. 그 후 4℃에서 보관하고 얻은 반응액을 PCR 증폭 반응액으로 한다.

*1 PCR 시약은 HotStarTaq Plus Master Mix(Qiagen 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 이용한다.

*2 호두 검출용 프라이머 쌍은 다음과 같다. 또한, 본 검사는 호두 검출용 프라이머 쌍(TBA 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 이용한다.

5'-프라이머(JUGc-F): 5'-[F-1]-AAACGGTTGGGAGGGCACGT-3'

3'-프라이머(JUGc-R): 5'-Biotin-CGCCCCGTGGTTACTCCTTGTTA-3'

*3 원칙적으로 DNA 시료액은 20 ng/μL의 농도로 조제해야 하지만, 검사 대상 검체에 따라서는 DNA 추출 효율이 좋지 않아 그보다 낮은 농도로만 조제할 수 있는 경우가 있을 수 있다. 이러한 경우에는 원칙에 가장 가까운 최대 농도로 조제하여 DNA 시료액으로 한다.

*4 PCR 증폭 장치는 상기 온도 조건을 달성할 수 있는 장치를 사용할 것.

2.2.5.3.3. 핵산 크로마토그래피를 이용한 캐슈너트 검지를 위한 PCR 증폭

PCR용 반응 시료관에 반응액을 다음과 같이 조제한다. 반응액은 PCR 시약^{*1} 5 μL, 5' 및 3'프라이머^{*2}(모두 10 μM) 각각 0.6 μL, 그리고 물 11.3 μL에 20 ng/μL로 조제한 DNA 시료액^{*3} 2.5 μL(DNA로서 50 ng)를 첨가하여, 총량을 20 μL로 만든다. PCR의 블랭크 반응액으로서, 반드시 DNA 시료액을 첨가하지 않은 것도 동시에 조제한다. 다음으로 그 반응 시료관을 PCR 증폭 장치^{*4}에 세팅한다. 반응 조건은 다음과 같다. 95℃에서 2분간 유지하여 반응을 시작시킨 후, 95℃ 5초, 67℃ 15초, 72℃ 10초를 1사이클로 하여 35사이클의 PCR 증폭을 수행한다. 그 후 4℃에서 보관하고, 얻어진 반응액을 PCR 증폭 반응액으로 한다.

*1 PCR 시약은 AllTaq Master Mix(Qiagen사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 제품을 사용한다.

*2 캐슈너트 검출용 프라이머 쌍은 다음과 같다. 또한, 본 검사에는 캐슈너트 검출용 프라이머 쌍(TBA 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 제품을 사용한다.

5'프라이머(STH_CS-F1): 5'-[F-1]- GAGTCGCGCCAAGGAATCTTAC -3'

3'프라이머(STH_CS-R1): 5'-Biotin- CGTTGCCGAGAGTCGTCAC -3'

*3 원칙적으로 DNA 시료액은 20 ng/μL의 농도로 조제해야 하지만, 검사 대상 검체에 따라 DNA 추출 효율이 좋지 않아 그보다 낮은 농도로만 조제할 수 있는 경우가 있을 수 있다. 이러한 경우에는 원칙에 가장 가까운 최대 농도로 조제하여 DNA 시료액으로 한다.

*4 PCR 증폭 장치는 상기 온도 조건을 달성할 수 있는 장치를 사용할 것.

2.2.5.4. 핵산크로마토그래피

2.2.5.4.1. 호두 검지를 위한 핵산크로마토그래피

1.5 mL 튜브에 전개액(개) 염 농도 0 mM^{*1} 10 μL, 아비딘 코팅 착색 라텍스액^{*1} 1 μL 및 PCR 증폭 반응액 10 μL를 넣고 잘 혼합한다. 테스트 스트립(C-PAS(F4))^{*1}의 흡수 패드를 잡고, 혼합된 용액에 삽입한 후, 실온에서 방치하여 전개시킨다^{*2}. 10~15분 후, 착색 라인의 유무를 육안으로 확인한다. 테스트 스트립 최상단 위치 마커 상단에 있는 주황색 선이 사라져

있으면 용액이 적절히 전개된 것으로 판단한다. 최하단 위치 마커 하단에 청색 착색선이 확인된 시료액은 표적으로 하는 배열이 PCR 증폭되었다고 판단한다.

*1 본 검사는 시약류 및 테스트 스트립(TBA 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*2 습도 40% 이상의 환경에서 사용한다. 그보다 습도가 낮은 경우, 비특이적인 착색 선이 검출되기 쉬우므로 주의한다.

2.2.5.4.2. 캐슈너트 검지를 위한 핵산크로마토그래피

2.2.5.4.1.에 따라 실시한다.

2.2.5.5. 결과 판정

2.2.5.5.1. 호두를 대상으로 한 PCR-핵산크로마토그래피 검사 결과 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭 반응액의 전기영동에서 124 bp 또는 370-470 bp의 PCR 증폭 밴드가 검출*되고, 호두 검지를 목적으로 하는 PCR-핵산 크로마토그래피법에서 표적으로 하는 배열이 PCR 증폭되었다고 판단되는 경우, 본 검사 대상 검체는 호두 양성으로 판정한다.

또한, 결과 판정 절차, 기준 및 판정 예는 2.2.3.5.1.에 기재된 땅콩을 대상으로 한 검사 결과 판정과 동일하다.

* 2.2.4.4.1.과 마찬가지로 식물 DNA 또는 동물 DNA 검출 Real-time PCR의 결과로 대체 하여 판단할 수도 있다.

2.2.5.5.2. 캐슈너트를 대상으로 한 PCR-핵산크로마토그래피 검사 결과 판정

식물 또는 동물 DNA 검출용 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭 반응액의 전기영동에서 124 bp 또는 370-470 bp의 PCR 증폭 밴드가 검출*되고, 캐슈너트 검지를 목적으로 하는 PCR-핵산 크로마토그래피법에서 표적으로 하는 배열이 PCR 증폭되었다고 판단되는 경우, 본 검사 대상 검체는 캐슈너트 양성으로 판정한다.

또한, 결과 판정 절차, 기준 및 판정 예는 2.2.3.5.1.에 기재된 땅콩을 대상으로 한 검사 결과 판정과 동일하다.

* 2.2.4.4.1.과 마찬가지로 식물 DNA 또는 동물 DNA 검출 Real-time PCR의 결과로 대체 하여 판단할 수도 있다.

2.2.6. LC-MS/MS법

LC-MS/MS법에서는 식품에서 효소 소화한 펩타이드를 조제하여 얻은 펩타이드 시료 용액을 이용하여 분석한다. 또한, 단백질 추출은 조제 시료 1개당 두 점을 병행하여 수행하며, 그 이후 표적 펩타이드 확인에 이르기까지의 모든 작업은 이 두 점에 대해 독립적으로 병행하여 수행한다.

2.2.6.1. 시료 조제법

1.1. 및 1.2.에 따라 시료를 조제한다.

2.2.6.2. 효소 소화 펩타이드 정제법

시료로부터 효소 소화 펩타이드를 얻기 위해서는 먼저 균질화된 시료에서 단백질을 추출하고 효소 처리를 통해 소화를 진행한다. 이어서, 얻어진 펩타이드 혼합물을 정제하고 농축 및 건조하여 회수한다. 일반적으로 효소 소화 펩타이드는 헤파를 제거한 단백질 추출액에 디티오프레이톨(DTT) 및 아이오도아세트아미드(IAA)를 첨가하여 환원·알킬화 처리를 한 후, 트립신 또는 키모트립신 등의 프로테아제를 통해 한정 분해하고, 고상 추출 컬럼 등을 이용하여 정제하는 것이 일반적이다. 검사의 대상물이 되는 효소 소화 펩타이드가 배열에 따라 다른 특징을 가지므로, 각 검사에 적합한 방법으로 정제를 수행한다. 본 항에서는 pNH법(양이온 교환 타입), pNS법(C18/음이온 교환 타입), pHF법(양이온/음이온 교환 타입)을 이용한 정제법을 기재한다.

또한 단백질의 추출 정제 시에 사용하는 물은 특별히 별도의 명시가 없는 한 모두 역삼투막 정제한 RO수 또는 증류수를 Milli-Q 등으로 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 한다.

2.2.6.2.1. pNH법(양이온 교환 방식)

조제 시료 2g을 폴리프로필렌 원심관(15 mL 용량)^{*1}에 계량해 넣고, 해당 원심관에 추출용 완충액(4M 요소, 1M 티오요소, 0.1M 디티오프레이톨 함유 0.2M 트리스-염산 완충액(pH 8.5)) 10 mL를 넣고, 볼텍스 믹서로 교반·혼합한다. 이어서, 37℃로 설정된 항온 진탕 수조에 원심관을 진탕 방향에 대해 수평으로 배열하여 1시간 동안 진탕한다. 그 후, 2,000×g 조건에서 10분간 원심분리한다. 원심분리된 상청액 1mL를 4mL의 희석용 용매(50 mM 탄산수소암모늄 수용액) 및 200 μL의 500 mM 요오드아세트아미드 용액을 미리 분주해 둔 별도의 원심관(15 mL 용량)^{*1}에 신속하게 옮기고, 볼텍스 믹서로 혼합한다. 혼합 후, 37℃로 설정한 항온 진탕 수조에 원심관을 수직으로 세워 30분간 진탕한다. 그 후, 원심관에 1% 트립신 용액^{*2}을 200 μL 첨가하여 볼텍스 믹서로 혼합하고, 37℃로 설정된 항온 진탕 수조에 원심관을 진탕 방향에 대해 수평으로 놓고 3시간 동안 진탕한다. 효소 소화 처리 후, 원심관에 포름산 55 μL를 첨가하고 볼텍스 믹서로 혼합한 뒤, 2,000×g 조건에서 10분간 원심분리한다.

원심분리하여 얻은 상청액을 양이온 교환형 고상 추출 컬럼^{*3}에 전량 주입한다. 이어서 용출액을 고상 추출 컬럼에 통과시켜, 10 μL 정도의 프로필렌글리콜을 적하한 배 모양 플라스크에 전량을 회수한다. 플라스크 내의 용매를 증류하여 제거^{*4}한 후, 0.5 mL의 5% 아세트니트릴 0.1% 포름산 수용액을 첨가하여 교반·혼합하고 펩타이드를 재용해한다. 용해액을 마이크로 원심관(0.5 mL 용량)^{*5}으로 옮기고, 10,000×g 조건에서 5분간 원심분리^{*6}한다. 원심분리 후, HPLC용 바이알^{*7}에 분주한 것을 NH법의 펩타이드 시료액으로 한다.

*1 시료액의 조제 및 채취는 2.2.6.1항에 기재된 방법에 따른다. 폴리프로필렌 원심관은 Protein Lo Bind Tubes 15 mL(Eppendorf사 제조) 또는 이와 동등한 결과를 얻을 수 있

는 것을 사용한다.

- *2 트립신은 소 췌장 유래 트립신(제품 번호 T1426, Sigma-Aldrich사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.
- *3 양이온 교환형 고상 추출 컬럼은 Oasis MCX 6 cc Vac Cartridge, 150 mg Sorbent per Cartridge, 60 μ m(Waters사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, Oasis MCX를 사용하는 경우, 컬럼에 5mL의 1% 암모니아 함유 메탄올, 5mL의 메탄올, 그리고 5mL의 초순수를 순서대로 통과시켜 컨디셔닝을 실시한다. 이어서 시료 용액을 컬럼에 주입(자연 낙하)한 후, 컬럼을 5mL의 1% 포름산 수용액 및 5mL의 80% 아세트ونی트릴 1% 포름산 수용액으로 순차적으로 세정한다. 컬럼에 흡착된 효소 분해 펩타이드는 5mL의 75% 아세트ونی트릴 5% 트리플루오로초산 수용액을 통과(자연 낙하)시키는 과정을 2회 반복하여 용출한다. 이때 용출액은 마지막에 주사기를 사용하여 모두 밀어내어 회수한다.
- *4 회전 농축기를 사용하여 50℃로 가열하는 것을 권장한다. 이때 용액이 갑작스럽게 끓어 오르지 않도록 주의한다.
- *5 마이크로 원심관은 프로테오세이브 SS 마이크로 튜브 0.5 mL(스미토모 베이클라이트사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 제품을 사용한다.
- *6 원심 여과 필터를 통과시킴으로써 분석기기에 가해지는 부하를 경감할 수 있는 경우가 있다. 필터는 TORAST-H Filter Device, 0.2 μ m, 친수화 PTFE(시마즈 GLC 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.
- *7 HPLC용 바이알은 TORAST-H PP Vial(시마즈 GLC 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

2.2.6.2.2. pNS법(C18/음이온 교환형)

조제 시료 1g을 폴리프로필렌제 원심관(50mL 용량)에 계량하여 담고^{*1}, 같은 원심관에 추출용 완충액^{*2} 19mL를 넣고, 끓는 물 욕조에서 10분간 가열한다. 그 동안 볼텍스 믹서로 총 3회(가열 처리 전, 가열 처리 중, 가열 처리 종료 후) 시료를 교반한다. 이어서, 저온(4℃), 10,000×g 조건에서 20분간 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 상층액을 2개의 마이크로 원심관(2mL 용량)^{*3}에 0.7mL씩 옮기고, 각각 70 μ L의 1M 트리에틸암모늄 탄산수소염 용액(pH 7.3-7.8)을 첨가한다. 이어서, 28 μ L의 1M 디티오프레이톨을 첨가하고, 즉시 볼텍스 믹서로 혼합한 뒤, 75℃로 설정된 항온조에서 15분간 가열한다. 가온 처리 후, 실온에서 15분간 방치하고, 사용 시 조제한 28 μ L의 1M 요오드아세트아미드를 첨가하여 신속히 볼텍스 믹서로 혼합한다. 실온의 어두운 곳에서 45분간 방치한 후, 0.1% 포름산 수용액으로 20 mg/mL로 조제한 10 μ L의 트립신^{*4}을 첨가하고 볼텍스로 혼합한 뒤, 37℃에서 1시간 이상 가열한다. 효소 소화 처리 후, 10 μ L의 포름산 수용액 및 892 μ L의 에틸 아세테이트를 첨가하고 볼텍스 믹서로 혼합한다. 이어서, 저온(4℃), 10,000×g 조건에서 5분간 원심분리하고, 분리된 상층액을 마이크로피펫으로 제거한 후, 물 층(하층) 중 0.7 mL를 새로운 마이크로 원심관(1.5 mL 용량)^{*3}으로 옮긴다. 분취한 물층에 20 μ L의 10 mg/mL 아밀로글루코

시다제를 첨가하고, 2개의 튜브 중 한쪽에만 100 μ L의 내부 표준액^{*5}을 첨가한다. 얻어진 용액을 농축 장치^{*6}를 이용하여 37℃에서 1시간 동안 농축한다. 농축된 용액에 500 μ L의 0.1% 포름산 수용액을 첨가하고, 저온(4℃), 10,000×g 조건에서 3분간 원심분리한다.

원심분리하여 얻은 상층액을 C18형 고상추출 컬럼^{*7}에 전량 주입한다. 이어서, 용출액을 고상추출 컬럼을 통과시키고 마이크로 원심관(1.5 mL 용량)에 전량을 회수한다.

얻은 용출액을 음이온 교환형 레진^{*8}을 계량하여 담은 마이크로 원심관(1.5 mL 용량)^{*3}에 넣고, 볼텍스 믹서로 교반·혼합한 후, 저온(4℃), 10,000×g 조건에서 3분간 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 상층액을 새로운 마이크로 원심관에 옮긴다. 이어서, 침전된 레진에 200 μ L의 60% 아세토니트릴 0.1% 포름산 수용액을 첨가하고, 볼텍스 믹서로 교반·혼합한다. 현탁 후, 저온(4℃), 10,000×g 조건에서 3분간 원심분리하고, 앞서 회수한 동일한 용기에 상층액을 옮긴다. 혼합한 상층액은 농축 장치를 이용하여 40℃에서 가열하며 용매를 증발시켜 제거하고, 시료를 완전히 건조시킨다. 용매가 남아 있지 않음을 확인한 후, 100 μ L의 5% 아세토니트릴 0.1% 포름산 수용액을 첨가하고, 피펫팅을 통해 펩타이드를 용해시킨 뒤, 필터^{*9}로 여과한 것을 NS법의 펩타이드 시료액으로 한다.

*1 시료액의 조제 및 채취는 2.2.6.1에 기재된 방법에 따른다.

*2 추출용 완충액은 APEX Reagents(GL Science 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*3 마이크로 원심관은 단백질 저흡착 튜브(Watson사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*4 트립신은 Worthington사 제품(Cat. No. TRTPCK) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*5 내부 표준액은 2종류의 표적 펩타이드의 말단 아르기닌 잔기를 안정 동위체 표식한 펩타이드 혼합액이며, 펩타이드①을 10 ppb, 펩타이드②를 20 ppb 함유한다. 또한, 내부 표준액을 첨가하지 않는 반응액에는 넣지 않도록 주의한다.

*6 농축 장치는 원심 농축기(遠心エバポレーター) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*7 C18 타입 고상 추출 컬럼은 MonoSpinC18 L형(GL Science사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, MonoSpinC18 L형을 사용하는 경우, 컬럼에 1 mL의 아세토니트릴 및 1 mL의 0.1% 포름산 수용액을 순차적으로 통과시켜 컨디셔닝을 실시한다. 이어서, 시료 용액을 컬럼에 주입(자연 낙하)한 후, 컬럼을 1 mL의 1% 아세토니트릴 0.1% 포름산 수용액으로 세정한다. 컬럼에 흡착된 효소 소화 펩타이드는 0.4 mL의 30% 아세토니트릴 0.1% 포름산 수용액을 통과시켜 용출한다. 또한, 컬럼에 용액을 통과시킬 때는 실온에서 600×g 조건으로 1분간 원심분리한다.

*8 음이온 교환형 레진은 InertSep SAX(입자 직경 45 μ m)(G.L.Science사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, InertSep SAX를 사용하는 경우, 튜브당 20 mg의 레진을 사용한다.

*9 필터는 코스모스핀 필터 G 0.2 μ m(나카라이 테스쿠사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을

수 있는 것을 사용한다.

2.2.6.2.3. pHF법(양이온/음이온 교환형)

조제 시료 1g을 폴리프로필렌 원심관(50 mL 용량)에 계량하여 담고^{*1}, 같은 원심관에 추출용 완충액^{*2} 19 mL를 넣고 볼텍스 믹서로 교반·혼합한다. 이어서 원심관을 진탕기에 가로로 배열하고, 실온 조건에서 하룻밤 동안 진탕한다. 그 후, 실온에서 3,000×g 조건으로 20분간 원심분리하고, 상층액을 여과지로 여과한 것을 시료 추출액으로 한다.

1 mL의 시료 추출액 및 외부 표준 용액^{*3}에 50 µL의 PVP 수용액, 200 µL의 HP-βCD 수용액, 10 µL의 안정 동위체 표식 펩타이드(내부 표준물) 수용액 및 50 µL의 키모트립신 수용액^{*4}을 첨가하고, 볼텍스 믹서로 혼합한 후 37℃에서 1.5시간 가온한다. 효소 소화 처리 후, 20 µL의 포름산을 첨가하여 볼텍스 믹서로 혼합하고, 실온에서 13,000×g 이상의 조건으로 10분간 원심분리한다.

원심분리하여 얻은 상층액을 양이온 교환형 고상 추출 컬럼^{*5}에 전량 적재한다. 이어서 용출액을 양이온 교환 고상 추출 컬럼에 통과시켜 전량을 회수한다. 얻어진 용출액에 등량의 물을 첨가하여 혼합한 후, 음이온 교환형 고상 추출 컬럼^{*6}에 전량 적재한다. 그 후, 용출액을 음이온 교환 고상 추출 컬럼에 통과시켜 전량을 회수하고, 농축 장치^{*7}를 이용하여 용매를 제거한다. 시료가 완전히 건조되었음을 확인한 후, 200 µL의 5% 아세트오니트릴 0.1% 포름산을 첨가하고, 볼텍스 믹서로 격렬하게 교반한 뒤, 마이크로 원심관(2 mL 용량)으로 옮긴다. 이어서 실온에서 13,000×g 이상의 조건으로 5분간 원심분리하고, 0.2 µm PTFE 주사기 필터로 여과하여 HPLC용 바이알^{*8}에 분취한 것을 HF법의 펩타이드 시료액으로 한다.

*1 시료액의 조제 및 채취는 2.2.6.1.에 기재된 방법에 따른다.

*2 추출용 완충액은 정량 검사법(ELISA법)의 추출용 완충액인 특정 원재료 추출액 ExStaTM액(모리나가 생화학연구소 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*3 외부 표준 용액은 별첨 3의 '표준품 규격'에 따라 조제한 표준액을 추출용 완충액으로 희석한 것으로, 특정 원재료 유래 단백질 함량이 조제 시료 1g당 10 µg/g(ppm) 상당을 함유한다.

*4 키모트립신은 소 췌장 유래 α-키모트립신(MP 바이오 케미컬사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

*5 양이온 교환형 고상 추출 컬럼은 InertSep MCX 60 mg/3 mL 컬럼(GL Science사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, InertSep MCX를 사용하는 경우, 컬럼에 1 mL의 메탄올 및 1 mL의 1% 포름산을 순차적으로 통과시켜 컨디셔닝을 실시한다. 이어서 시료 용액을 컬럼에 주입한 후, 컬럼을 1 mL의 1% 포름산 및 1 mL의 메탄올로 순차적으로 세정한다. 컬럼에 흡착된 효소 분해 펩타이드가 0.5 mL의 80% 메탄올 1% 암모니아 및 0.5 mL의 50% 메탄올 1% 암모니아를 순차적으로 통과시켜 동일한 용기에 회수한다. 컬럼에 용액을 통과시킬 때는 실온에서 200×g 조건으로 1분간 원심분리해도 된다.

*6 음이온 교환형 고상 추출 컬럼은 InertSep MAX 60 mg/3 mL 컬럼(GL Science사 제조)

또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, InertSep MAX를 사용하는 경우, 컬럼에 1 mL의 메탄올 및 1 mL의 물을 순차적으로 통과시켜 컨디셔닝을 실시한다. 이어서 시료 용액을 컬럼에 주입한 후, 컬럼을 1 mL의 물 및 1 mL의 메탄올로 순차적으로 세정한다. 컬럼에 흡착된 효소 분해 펩타이드가 0.5 mL의 99% 메탄올 1% 포름산 및 0.5 mL의 20% 메탄올 1% 포름산을 순차적으로 통과시켜 동일한 용기에 회수한다. 컬럼에 용액을 통과시킬 때는 실온에서 200×g 조건으로 1분간 원심분리해도 된다.

*7 농축 장치는 원심 증발기 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용하며, 가열할 때는 용액이 돌비(突沸)하지 않도록 주의할 것.

*8 HPLC용 바이알은 재질이 TPX 수지인 것 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다.

2.2.6.3. 효소 소화 펩타이드의 정제도 확인

펩타이드 시료 용액에 대해 200~320 nm 범위에서 자외선 흡수 스펙트럼을 측정한다. 이때 230 nm, 260 nm 및 280 nm의 흡광도(O.D. 230, O.D. 260 및 O.D. 280)를 기록한다*. 이어서 O.D. 280 값 1을 1 mg/mL 상당의 단백질로서 펩타이드 농도를 산출한다. BCA법에 의한 비색 분석이나 아미노산 분석 등을 통해 펩타이드 농도를 산출해도 된다. 시료액 중의 펩타이드 농도가 2.2.6.4.2.1.부터 2.2.6.4.2.3.까지에 기재된 상한 농도를 초과하는 경우, 원칙적으로 사용하는 기기의 성능을 고려하여 주입량의 감축이나 희석 등을 검토하고, LC-MS/MS 측정을 수행한다. 또한, 블랭크 용액과 비교하여 시료액 중 상당량의 펩타이드가 확인되지 않는 경우에는 해당 검사 대상 검체로부터의 펩타이드 정제가 어려울 가능성을 고려하여, 정성 LC-MS/MS 법에 의한 검지 가능 여부를 포함하여 결과를 종합적으로 판단한다.

* 펩타이드 결합에 기인하는 흡수 파장인 O.D. 230과 방향족 아미노산의 흡수 파장인 O.D. 280의 비율을 계산한다. 또한 핵산의 특징적인 흡수인 O.D. 260과 O.D. 280의 비율을 계산한다. O.D. 280/O.D. 230 비율 또는 O.D. 260/O.D. 280 비율이 각각 (0.2 - 0.6) 또는 (0.5 - 0.9) 범위에 있는 것이 바람직하다.

이 조건을 충족하는 펩타이드 시료액의 품질이 확인되지 않는 경우, 헤파 성분 영향 등으로 인해 측정 감도가 저하될 수 있다.

2.2.6.4. 정성 LC-MS/MS 법

정성 LC-MS/MS 법에서는 액체 크로마토그래피(LC)를 이용하여 펩타이드 시료액에 포함된 성분을 분리하고, 탠덤 질량 분석기(MS/MS)를 통해 특정 프리커서 이온을 단편화시켜 생성되는 프로덕트 이온을 검출한다. 본 방법을 통해 대상인 특정 원재료를 특이적으로 검지할 수 있으며, 표적 펩타이드에 특유의 프리커서 이온과 프로덕트 이온의 조합을 확인함으로써, 검사 대상 검체 내의 특정 원재료 유무를 판정한다.

2.2.6.4.1. LC-MS/MS 측정

정성 LC-MS/MS 법으로 검지 가능한 특정 원재료는 캐슈너트 1종이다. 본 방법에서는 캐

슈너트에 함유된 단백질에서 유래하는 특이적인 펩타이드 서열을 표적으로 하여, 2.2.6.4.2.에 기재된 방법을 이용하여 검사를 수행한다. 검사는 1개의 조제 시료당 2점을 병행하여 추출하고, 효소 소화 후 정제한 펩타이드 시료액을 검체액으로 사용한다. 이를 각 정제법에 따른 규정 절차에 따라 LC에 주입*하고, MS/MS를 통해 측정을 수행한다.

* 주입량을 과도하게 증가시키면, 비휘발성 성분 등이 시료 내에 잔존한 경우, 이온 소스의 오염이나 컬럼 열화를 초래하여 감도 저하 및 피크 형상 악화, 그리고 유지시간 변동을 일으킬 수 있다. 따라서 실제 실험 조작 및 평소의 실험 환경 보전에 있어서 사전에 주입량을 줄인 조건에서 감도 등을 확인하고, 사용하는 기기의 성능에 따라 단계적으로 주입량 증량을 검토하는 것이 바람직하다.

2.2.6.4.2. 캐슈너트 검지를 위한 LC-MS/MS 측정

2.2.6.4.2.1. 캐슈너트-NH 법 (내부 표준물 미첨가·신호 노이즈비 판정)

분석 대상은 2.2.6.2.1.에 기재된 pNH 법으로 조제한 펩타이드 시료액*¹으로 한다.

탈기된 이동상 A(0.2% 초산 수용액) 및 B(0.2% 초산 함유 아세트니트릴 용액)를 LC 시스템의 튜브에 연결하고, 플로우 라인의 에어 퍼지를 수행한 후 시스템 평형화를 실시한다. 이어서 표적 펩타이드 ①, ②의 표준품을 각각 LC-MS/MS 시스템에 주입하고, MS 분석 조건 최적화를 수행한다. 분석 조건 설정에서는 먼저 이온화 방식으로 전기분무이온화법(ESI)의 양이온 모드를 선택한다. 다음으로, 이온화되는 펩타이드 중 MS에서 선별할 특정 질량 전하비(m/z)를 가진 프리커서 이온과, MS/MS로 분석할 충돌 셀에서 단편화되는 생성 이온을 선택하고, 각 이온 쌍을 측정하기 위한 다중 반응 모니터링(MRM)에서 신호 강도가 최대가 되도록 파라미터*²를 최적화한다. 최적화 후, LC 시스템에 옥타데실 실릴화 실리카겔 컬럼*³을 연결하고, 컬럼 오븐을 적정 온도로 설정한 후, 0.4 mL/min의 유속으로 컬럼 평형화를 수행한다. 이어서, 표적 펩타이드 ①, ②의 혼합액을 LC 시스템에 주입하여 표적 펩타이드의 컬럼 유지 시간*⁴을 확인한다. 분석 대상 확인 후, 최적화된 분석 조건에 따라 시료를 측정한다. 먼저, 표적 펩타이드 ①, ②의 혼합액(10 ng/mL)을 주입하고, 측정을 3회 반복하여 유지 시간에 문제가 없는지 확인한다. 표적 펩타이드 ①, ② 혼합액 측정 후, 블랭크 용액 측정을 3회 반복하고, pNH 법에 따라 조제한 검액 측정을 시작한다.

주입량*⁵은 사용하는 측정 기기의 감도에 따라 설정한다. 또한, 연속 분석을 실시할 때에는 10개 검체마다 1회의 블랭크 용액 측정을 끼워넣을 것. 또한, 검액 전체의 측정이 종료된 후에는 다시 블랭크 용액을 1회 측정한 뒤, 표적 펩타이드 ①, ②의 혼합액을 재측정하여 유지 시간 및 분석 기기의 감도에 변동이 없는지 확인할 것.

LC 그라디언트 조건*⁶

시간, 분	%B
0.00	5
3.00	5
15.00	40
16.00	95
20.00	95

20.01	5
25.00	5 (Stop run)

LC-MS/MS 연결부의 배관 직경이 0.1~0.18 mm인 경우, 유속은 0.4 mL/분으로 한다. 또한, 오토샘플러를 사용할 때의 설정 온도는 10℃로 한다.

표적 펩타이드 검출 조건 (MRM 트랜지션)

펩타이드	프리커서 이온(m/z)	프로덕트 이온(m/z)
표적 펩타이드① ADIYTPEVGR	560.8	557.3
		658.4
		821.4
표적 펩타이드② LTTLNSLNLPILK	720.4	298.2
		470.3
		1011.6

LC-MS/MS 데이터 수집 시간은 펩타이드 표준품 유지 시간의 전후 1분 정도로 한다*7.

- *1 시료액의 펩타이드 농도가 8 mg/mL를 초과하는 경우에는 주입량 감축 등을 검토한다.
- *2 파라미터는 충돌 에너지(CE) 및 이온화 전압, 그리고 사용하는 장치의 특성에 따른 항목으로 한다.
- *3 옥타데실실릴화 실리카겔 컬럼은 Raptor Inert ARC-18 2.7 μm, 3.0×100 mm(Restek 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, Raptor Inert ARC-18을 사용하는 경우, 컬럼 오븐의 설정 온도는 50℃로 한다.
- *4 Raptor Inert ARC-18을 사용할 경우의 컬럼 유지 시간 기준은 표적 펩타이드①은 7.7분, 표적 펩타이드②는 11.7분으로 하되, 측정 시 사용하는 기기에 따라 차이가 있을 수 있다.
- *5 주입량은 표적 펩타이드의 컬럼 유지 시간에 미치는 영향이나 감도 저하를 고려하여 10 μL 이하로 설정하는 것이 바람직하다.
- *6 사용하는 LC 기종에 따라 컬럼 세정 및 평형화 시간이 불충분하다고 판단되는 경우에는 각 시간을 연장해도 좋다. 기본적으로는 각 용매의 비율은 변경하지 않는다. 단, 지정된 그라디언트 조건에서 표적 펩타이드와 협잡 성분의 분리가 불충분하다고 판단되는 경우에는 3-15분 5-40% B에서 3-30분 5-30% B로 변경하는 것이 바람직하다.
- *7 MS 오염에 의한 감도 저하를 억제하기 위해, LC-MS의 밸브 전환 시간을 설정하고, MS 측으로 이동상을 흘리는 시간은 표적 펩타이드①의 유지 시간 1.5분 정도 전부터, 표적 펩타이드②의 유지 시간 1.5분 정도 후까지로 하는 것이 바람직하다.

2.2.6.4.2.2. 캐슈너트-NS 법(2단계 내부 표준물 상대비 판정)

분석 대상은 2.2.6.2.2.에 기재된 pNS 법으로 조제한 펩타이드 시료액*1으로 한다.

탈기된 이동상 A(0.2% 초산) 및 B(0.2% 초산-아세트니트릴)를 LC 시스템의 튜브에 연결하고, 플로우 라인의 에어 퍼지를 실시한 후, 시스템 평형화를 수행한다. 이어서, 안정 동위체로 표식된 표적 펩타이드 ①, ②의 표준품을 각각 LC-MS/MS 시스템에 주입하고, MS 분석 조건 최적화를 수행한다. 분석 조건 설정에서는 먼저 이온화 방식으로 전기분무 이온화법(ESI)의 양이온 모드를 선택한다. 다음으로, MS에서 선별할 특정 m/z를 가진 프리커서 이온과

MS/MS에서 분석할 프로덕트 이온을 선택하고, MRM 모드에 대한 신호 강도가 최대가 되도록 파라미터^{*2}를 최적화한다. 최적화 후, LC 시스템에 옥타데실실릴화 실리카겔 컬럼^{*3}을 연결하고, 컬럼 오븐을 적정 온도로 설정한 뒤, 0.3 mL/분의 유속으로 컬럼 평형화를 수행한다. 이어서, 안정 동위체로 표식된 표적 펩타이드 ①, ②의 혼합액(①10 ppb, ②20 ppb)을 LC 시스템에 주입하고, 이동상 B 그라디언트 조건 하에서 표적 펩타이드의 컬럼 유지 시간^{*4}을 확정한다. 분석 대상을 확인한 후, 최적화한 분석 조건에 따라 시료를 측정한다. 먼저, 블랭크 용액을 주입하여 크로마토그램의 베이스라인이 안정적인지 확인한다. 이어서, 안정 동위체로 표식된 표적 펩타이드 ①, ②의 혼합액(① 1 ppb, ②2 ppb)을 측정한 후, pNS 법으로 조제한 검액 측정을 시작한다. 주입량^{*5}은 측정 기기의 감도에 따라 설정하고, 먼저 내부 표준물 무첨가 펩타이드 검액을 측정한 후, 내부 표준물 첨가 펩타이드 검액을 측정한다. 또한, 연속 분석을 할 때는 20개 검체 당 1회의 블랭크 용액 측정을 삽입할 것. 아울러, 모든 검액 측정이 종료된 후, 안정 동위체로 표식된 표적 펩타이드 ①, ②의 혼합액(① 1 ppb, ② 2 ppb) 검액을 재측정하여, 유지 시간 및 분석 기기의 감도에 변동이 없음을 확인할 것.

LC 그라디언트 조건

시간, 분	%B
0	5
16	25
18	95
23	95
23.1	5
30	5 (Stop run)

LC-MS/MS 연결부의 배관 직경이 0.1~0.18 mm인 경우, 유속은 0.3 mL/분으로 한다. 또한, 오토샘플러를 사용할 때의 설정 온도는 18℃로 한다.

표적 펩타이드 검출 조건 (MRM 트랜지션)

	표적 펩타이드		안정 동위체 표식 펩타이드 (아르기닌)	
	프리커서 이온(m/z)	프로덕트 이온(m/z)	프리커서 이온(m/z)	프로덕트 이온(m/z)
지표 펩타이드 ① GQVQVVDNFGN R	666.8	920.5	671.8	930.5
		821.4		831.4
		722.3		732.3
	444.9	722.3	448.2	732.3
지표 펩타이드 ② DVFQQQQQHQS R	510.2	657.8	513.6	662.8
		438.9		442.2

LC-MS/MS 데이터 수집 시간은 펩타이드 시료의 유지 시간 전후 0.5분 이상으로 한다.

*1 시료액의 펩타이드 농도가 8 mg/mL를 초과하는 경우, 주입량 감축 등을 검토한다.

*2 파라미터는 충돌 에너지(CE) 및 이온화 전압, 그리고 사용하는 장비의 특성에 따른 항목으로 한다.

*3 옥타데실실릴화 실리카겔 컬럼은 카트리지 컬럼 3 μm 2.1×10 mm를 가드 컬럼으로 연

결한 Triart C18 메탈 프리 3 μm , 2.1×100 mm(YMC사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, Triart C18 메탈 프리를 사용하는 경우, 컬럼 오븐의 설정 온도는 50℃로 한다.

- *4 Triart C18 메탈프리를 사용할 경우의 컬럼 유지 시간 기준은 지표 펩타이드①은 9.7분, 지표 펩타이드②는 4.7분으로 하되, 측정 시 사용하는 기종에 따라 차이가 있을 수 있다.
- *5 주입량은 표적 펩타이드의 컬럼 보유 시간에 미치는 영향 및 감도 저하를 고려하여, 2~10 μL 정도로 설정하는 것이 바람직하다.

2.2.6.4.2.3. 캐슈너트-HF법 (1단계 내부 표준물 상대비 판정)

분석 대상은 2.2.6.2.3.에 기재된 pHF 법으로 조제한 펩타이드 시료액^{*1}으로 한다.

탈기된 이동상 A(0.1% 포름산) 및 B(0.1% 포름산-아세트니트릴)를 LC 시스템의 튜브에 연결하고, 유로 라인의 에어 퍼지를 실시한 후, 시스템 평형화를 수행한다. 이어서, 안정 동위체 표식된 표적 펩타이드 ①, ②의 표준품을 각각 LC-MS/MS 시스템에 주입하고, MS 분석 조건의 최적화를 수행한다. 분석 조건 설정에서는 먼저 이온화 방식으로 전기분무 이온화법(ESI)의 양이온 모드를 선택한다. 다음으로, MS에서 선별할 특정 m/z를 가진 프리커 이온과 MS/MS에서 분석할 프로덕트 이온을 선택하고, MRM 모드에 관한 신호 강도가 최대가 되도록 파라미터^{*2}를 최적화한다. 최적화 후, LC 시스템에 옥타데실실릴화 실리카겔 컬럼^{*3}을 연결하고, 컬럼 오븐을 적정 온도로 설정한 뒤, 0.3 mL/분의 유속으로 컬럼 평형화를 수행한다. 다음으로, 블랭크 용액을 LC 시스템에 주입하고, 이동상 B의 그라디언트 조건 하에서 크로마토그램의 베이스라인이 안정적인지 확인한다. 그 후, 동일한 조건에서 안정 동위체 표식된 펩타이드 ①, ②의 혼합액을 측정하여 컬럼 유지 시간^{*4}을 확정한다. 분석 대상 확인 후, 시료 측정을 시작한다. 먼저, 외부 표준 검액을 측정하며, 주입량^{*5}은 사용하는 측정 기기의 감도에 따라 설정한다. 이어 블랭크 용액을 측정하여 캐리오버가 없는 것을 확인한 후, 검액을 측정한다. 또한, 모든 검액 측정 종료 후, 외부 표준 검액을 다시 측정하여, 유지 시간 및 분석 기기의 감도에 변동이 없음을 확인할 것.

LC 그라디언트 조건^{*6}

시간, 분	%B
0	5
20	25
20.1	95
25	95
25.1	5
30	5 (Stop run)

LC-MS/MS 연결부의 배관 직경이 0.1~0.18 mm인 경우, 유속은 0.3 mL/분으로 한다. 또한, 오토샘플러를 사용할 때의 설정 온도는 10℃로 한다.

표적 펩타이드 검출 조건(MRM 트랜지션)*7

	표적 펩타이드		안전 동위체 표식 펩타이드	
	프리커서 이온(m/z)	프로덕트 이온(m/z)	프리커서 이온(m/z)	프로덕트 이온(m/z)
지표 펩타이드 ① KGEEVEELY	548.2645	801.3625	552.2716	809.3767
		914.4478		922.4620
지표 펩타이드 ② RGEEVEELY	562.2652	829.3679	567.2716	839.3762
		942.4527		952.4610

LC-MS/MS 데이터 취득 시간은 지표 펩타이드 유지 시간의 전후 2분으로 한다.*8

*1 시료액의 펩타이드 농도가 15 mg/mL를 초과하는 경우, 주입량 감축 등을 검토한다.

*2 파라미터는 충돌 에너지(CE) 및 이온화 전압, 그리고 사용하는 장치의 특성에 따른 항목으로 한다.

*3 옥타데실실릴화 실리카겔 컬럼은 InertSustain AX-C18 3 μm, 3.0×150 mm(GL Science 사 제조) 또는 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 사용한다. 또한, InertSustain AX-C18을 사용하는 경우, 컬럼 오븐의 설정 온도는 50℃로 한다.

*4 InertSustain AX-C18을 사용할 경우의 컬럼 유지 시간 기준은 지표 펩타이드①은 9.2분, 지표 펩타이드②는 9.5분으로 하되, 측정 시 사용하는 기종에 따라 차이가 있을 수 있다.

*5 주입량은 표적 펩타이드의 컬럼 유지 시간에 미치는 영향이나 감도 저하를 고려하여, 5~10 μL 정도로 설정하는 것이 바람직하다. 또한, 고감도 분석 기기를 사용하는 경우, 외부 표준의 감도에 비추어 주입량을 더욱 줄여 2 μL로 해도 무방하다.

*6 기본적으로는 각 용매의 비율은 변경하지 않는다. 단, 지정된 그라디언트 조건에서 표적 펩타이드와 협잡 성분의 분리가 불충분하다고 판단되는 경우에는 25% B에 도달하기까지의 소요 시간을 20분에서 30분으로 변경하여 분석하는 것이 바람직하다.

*7 설정 가능한 m/z 값이 소수점 이하 1자리까지인 장치는 아래 표의 소수점 이하 2자리를 반올림한 m/z 값을 사용한다.

*8 MS 오염에 의한 감도 저하를 억제하기 위해, LC-MS/MS의 밸브 전환 시간을 설정하고, MS 측으로 이동상을 흘리는 시간은 데이터 취득 시간에 맞춰 설정하는 것이 바람직하다.

2.2.6.5. 결과 분석

LC-MS/MS 장치를 이용하여 특정 컬럼 유지 시간을 나타내는 펩타이드의 이온 신호를 분석하고, 각 펩타이드 시료액에 대해 특정 원재료에서 유래한 펩타이드의 유무를 판단한다. 표적 펩타이드 표준품과 동일한 컬럼 유지 시간에서 특정 트랜지션이 확인된 시료액은 표적으로 삼은 펩타이드가 검출된 것으로 판단한다.

2.2.6.5.1. 캐슈너트를 대상으로 한 LC-MS/MS 측정 결과 분석

2.2.6.5.1.1. 캐슈너트-NH 법 (내부 표준물 미첨가·신호 노이즈비 판정)

분석 대상은 2.2.6.4.2.1.에 기재된 캐슈너트-NH 법으로 측정된 시료이다.

먼저, 표적 펩타이드의 검출 조건 표에 따라 표적 펩타이드 ①, ②의 혼합액 측정 결과로부터 각 펩타이드의 컬럼 유지 시간과 각 MRM 트랜지션의 크로마토그램을 확인한다^{*1}. 이어서, 검체의 크로마토그램에서 각 표적 펩타이드의 유지 시간 부근에 피크가 확인된 경우, 노이즈 범위^{*2}를 지정하고 각 피크의 신호 대 노이즈(S/N) 비율을 계산^{*3}한다.

*1 각 표적 펩타이드의 크로마토그램은 각각 3종류의 MRM 트랜지션 크로마토그램을 중첩시켜 확인하는 것이 바람직하다.

*2 노이즈 범위는 표적 펩타이드 ① 및 ②의 피크 전후에 협잡 성분에서 유래한 피크가 관찰되지 않는 0.5분 정도로 한다.

*3 S/N 비율의 산출 방법을 분석 소프트웨어에서 설정 가능한 경우, 계산 방법은 제공 평균제곱근(RMS)법으로 한다. 또한, 사중극자-비행시간형 질량분석기(Q-TOFMS)나 사중극자-킹던 트랩형 질량 분석기(Orbitrap™) 등 고분해능형 질량 분석기로 측정했을 경우, 얻어지는 측정 노이즈가 0이므로 S/N 비율이 산출되지 않는 경우가 있다. 이 경우, 검출된 피크는 S/N 비율이 10을 만족하는 것으로 본다.

2.2.6.5.1.2. 캐슈너트-NS 법(2단계 내부 표준물 상대비 판정)

분석 대상은 2.2.6.4.2.2.에 기재된 캐슈너트-NS 법으로 측정된 시료이다.

먼저, 표적 펩타이드의 검출 조건 표에 따라 내부 표준물 첨가와 내부 표준물 무첨가 결과를 비교하여 표적 펩타이드의 컬럼 유지 시간을 확정^{*1}한다. 이어서, 내부 표준물 첨가의 결과에 대해, 각 트랜지션^{*2}마다 표적 펩타이드의 신호 면적에서 안정 동위체 표식 펩타이드의 신호 면적^{*3}을 나눠서 면적비를 산출한다.

*1 내부 표준물을 첨가한 검액에서만 확인되는 신호를 안정 동위체 표식한 표적 펩타이드 유래의 피크로 본다. 매트릭스 효과 등으로 인해 해당 피크를 확인할 수 없을 경우, 또는 얻은 신호가 외부 표준 이하의 강도인 경우, 미검출로 판단한다. 또한, 주입량이 많은 경우 등에는 표적 펩타이드의 컬럼 유지 시간이 검체에 따라 크게 변화할 수 있으므로, 대상 시간을 넓혀 분석할 것.

*2 각 펩타이드의 트랜지션은 유지 시간이 모두 ± 0.05 분 이내로 일치하는지 확인한다.

*3 안정 동위체 표식 펩타이드의 신호 면적은 협잡 성분에서 유래한 방해 피크에 의한 영향을 배제하기 위해, 내부 표준물을 첨가하지 않은 분석 데이터에서 구한 협잡 성분 유래 신호 면적을 차감하여 산출한다. 또한, 큰 방해 피크가 존재하는 경우, 크로마토그램의 세로축 강도에 주의하고 적절히 확대하여 확인할 것.

2.2.6.5.1.3. 캐슈너트-HF 법(1단계 내부 표준물 상대비 판정)

분석 대상은 2.2.6.4.2.3.에 기재된 캐슈너트-HF 법으로 측정된 시료이다.

표적 펩타이드의 검출 조건 표에 따라, 시료 측정 결과에서 각 지표 펩타이드의 컬럼 유지 시간에서 발생하는 각 트랜지션별로 표적 펩타이드의 신호 면적을 안정 동위체 표식 펩타이드의 신호 면적^{*1}으로 나누어 면적비^{*2}를 산출한다.

*1 안정 동위원소로 표식된 표적 펩타이드의 컬럼 유지 시간 ± 0.1 분 이내에 검출된 신호

를 표적 펩타이드 유래의 트랜지션으로 판단한다. 측정된 외부 표준 중 어느 하나의 트랜지션에서 신호를 확인할 수 없는 경우, 효소 분해 펩타이드의 정제 또는 사용하는 장치의 MS 분석 조건 최적화 등을 다시 수행한다.

*2 표적 펩타이드 유래 트랜지션에서 신호를 확인할 수 없는 경우, 비검출로 본다.

2.2.6.6. 결과 판정

2.2.6.6.1. 캐슈너트를 대상으로 한 LC-MS/MS 검사 결과 판정

2.2.6.6.1.1. 캐슈너트-NH 법(내부 표준물 미첨가·신호 노이즈비 판정)

판정 대상은 2.2.6.5.1.1. 캐슈너트-NH 법으로 분석된 검사 결과이다.

조제 시료 1개에서 2점을 병행하여 추출하고 펩타이드 시료액을 조제한 후, LC-MS/MS 법을 실시한다. 그 결과, 각 표적 펩타이드에서 모든 MRM 트랜지션이 S/N비 10 이상을 충족하는 피크로 검출된 경우, 본 검사 대상 검체는 캐슈너트 양성으로 판정한다.

2.2.6.6.1.2. 캐슈너트-NS 법(2단계 내부 표준물 상대비 판정)

판정 대상은 2.2.6.5.1.2. 캐슈너트-NS 법으로 분석된 검사 결과이다.

조제 시료 1개에서 2점을 병행하여 추출하고, 펩타이드 시료액을 조제한 후, LC-MS/MS 법을 실시한다. 그 결과, 검출된 각 표적 펩타이드의 모든 트랜지션에서 시료 중 표적 펩타이드의 신호 면적값이 안정 동위체 표식된 펩타이드의 신호 면적값의 10분의 1 이상인 경우, 본 검사 대상 검체는 캐슈너트 양성으로 판정한다. 또한, 안정 동위체 표식 펩타이드의 신호를 검출할 수 없었던 트랜지션은 미검출로 간주하여 판정 대상에서 제외*하고, 각 지표 펩타이드 당 하나의 트랜지션이 검출되면 판정 대상으로 할 수 있다.

* 안정 동위체로 표식된 지표 펩타이드 유래의 트랜지션 신호가 모두 검출되지 않은 경우, 해당 검사 대상에 대한 NS법에 의한 정성 분석은 불가능하며, 검출 불가로 판단한다.

2.2.6.6.1.3. 캐슈너트-HF 법(1단계 내부 표준물 상대비 판정)

판정 대상은 2.2.6.5.1.3. 캐슈너트-HF 법으로 분석된 검사 결과이다.

1개의 조제 시료에서 2점을 병행하여 추출하고, 펩타이드 시료액을 조제한 후, LC-MS/MS법을 실시한다. 그 결과, 각 표적 펩타이드의 모든 트랜지션에 대해 시료에서 산출된 신호 면적비가 외부 표준에서 산출된 신호 면적비의 10분의 1 이상인 경우, 본 검사 대상 검체는 캐슈너트 양성으로 판정한다. 또한, 안정 동위체 표식 펩타이드의 신호가 검출되지 않은 트랜지션*은 미검출로 하여 판정 대상에서 제외하고, 각 안정 동위체 표식 펩타이드에 대해 1개의 트랜지션이 검출되면 판정 대상으로 할 수 있다.

* 안정 동위체 표식 펩타이드의 신호 강도가 외부 표준의 안정 동위체 표식 펩타이드의 신호 강도에 비해 1/4 이하가 되어 대응하는 표적 펩타이드 유래의 트랜지션을 검출할 수 없는 경우, 해당 검사 대상에 대한 HF 법에 의한 정성 분석은 불가능하므로 검출 불가로 판단한다.

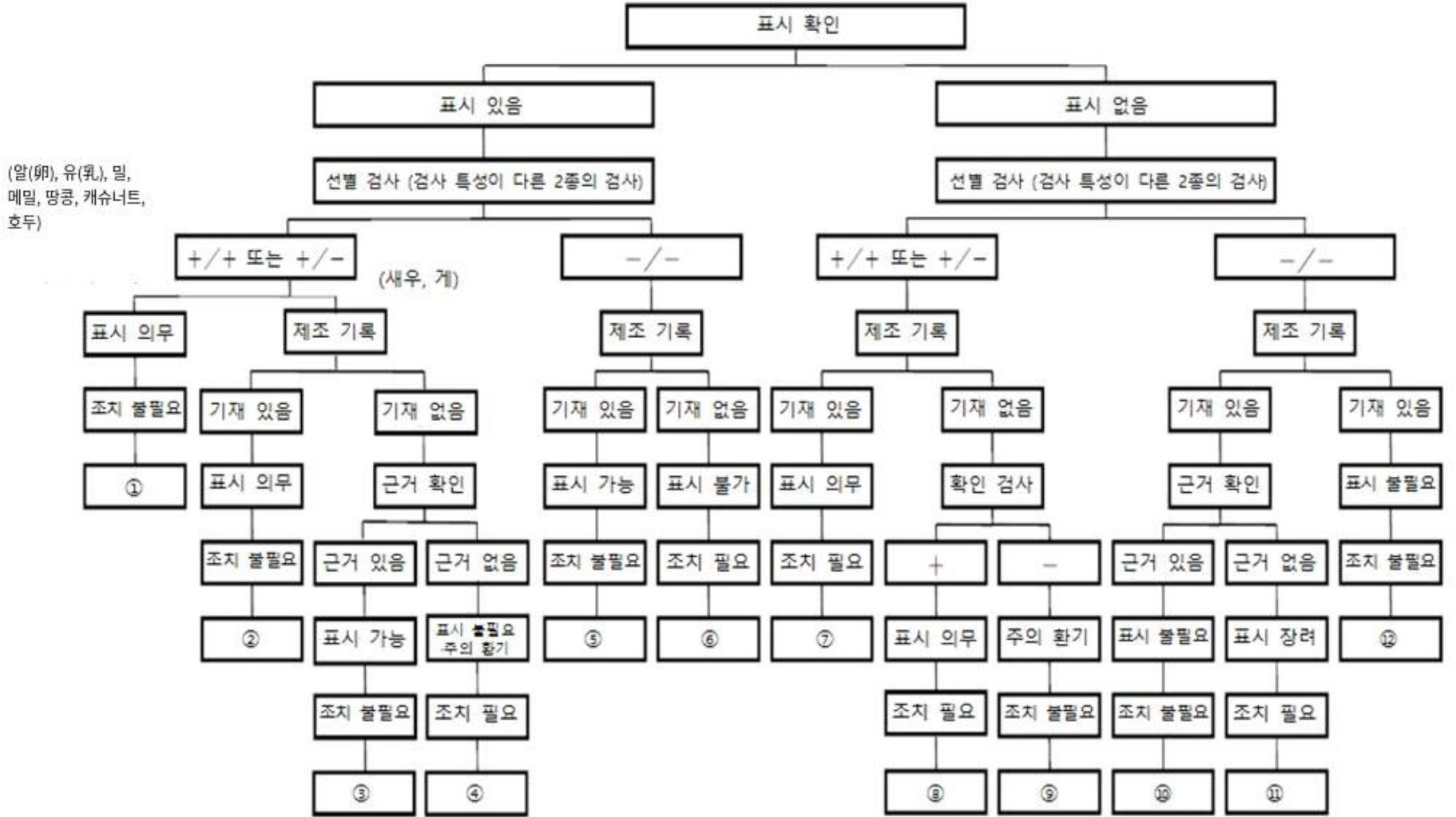
2.3. 「2.1. 정량검사법」을 개량한 정량검사법

「2.1. 정량검사법」에서 제시한 검사방법(이하 ‘기존법’이라 한다)을 개량한 정량검사법(개량검사법)에 대해서는 (별첨 5) <알레르겐을 함유하는 식품의 검사방법 개량법 평가에 관한 가이드라인>에 따라 성능을 평가하여, 기존법의 동등 이상의 성능을 지녔다는 것을 제시한 경우에는 기존법과 동일하게 알레르기 유발물질을 함유하는 식품의 검사방법으로 사용하는 것이 인정된다.

3. 유의점

식품 중의 특정 원재료 등과 관련된 검사는 원칙적으로 별첨 1 <의사결정나무>에 따라 실시한다. 또한 별첨 2 <의사결정나무에 대해서>를 반드시 참조한다.

본 검사방법에서 사용하는 표준품의 규격은 별첨 3과 같으며, 검사를 실시하는 경우에 참고할 것.



의사결정나무에 대해서

1. 기본적인 주의사항

- (1) 의사결정나무는 건강피해 방지의 관점에서 현재의 과학적 지식을 바탕으로 알레르기 증상을 유발할 수 있는 식품의 잘못된 표시로 인한 피해를 가능한 한 방지하기 위하여 구성되었다.
- (2) 식품 중의 특정 원재료에 대한 감시는 원칙적으로 이 의사결정나무에 따라 실시한다.
- (3) 검사에는 위양성 또는 위음성을 나타내는 식품이 존재하므로 판단에 충분히 주의해야 한다. 모든 검사에서 위양성 또는 위음성의 정보를 참조하여 위양성 또는 위음성을 반드시 확인한다.
- (4) 모든 검사에서 제조기록을 반드시 확인한다. (단, 의사결정나무 branch①의 경우만 생략 가능)

2. 선별 검사에 대해서

- (1) 선별 검사는 정량검사법으로 실시한다. 효소면역측정법 이외의 정량검사법을 사용할 수도 있으나 그 경우에는 효소면역측정법과 동등하거나 그 이상의 성능을 지닌 검사법을 사용해야 한다.
- (2) 선별 검사는 검사 특성이 다른 2종의 검사를 조합하여 실시한다.
- (3) 선별 검사에서 양성이란 식품채취중량 1g당 특정 원재료 유래 단백질 함유량이 10 μ g 이상인 것을 말한다^{*1}.
- (4) 새우 및 계의 감시에서 선별 검사로는 새우와 계를 구별할 수 없다는 점에 유의해야 한다.
※ 1 후생노동과학연구비보조금을 통하여 2001년 10월 29일에 발표된 <식품표시가 미치는 사회적 영향과 그 대책 및 국제비교에 관한 연구반 알레르기표시검토회 중간보고서>에서 '수 μ g/mL 농도 수준 또는 수 μ g/g 함유 수준 이상의 특정 원재료 등의 총단백질을 함유하는 식품에 대해서는 표시가 필요하다고 판단된다.'고 한 내용에 따른 것.

3. 제조기록의 확인에 대해서

- (1) 여기서 말하는 '제조기록'이란 제조레시피(배합표를 포함한다), 작업절차서, 작업일보, 검사성적서, 갠트차트(라인별 제조예정표), 품질(성분)보증서, 규격서(성분정보를 포함한다), 특정 원재료를 포함하지 않는다는 내용의 증명서 등을 말한다.
- (2) 제조기록에 기재되어 있음에도 불구하고 표시가 없는 것에 대해서는 그 근거를 반드시 확인한다. 또한 제조기록에 기재가 없음에도 불구하고 표시가 있는 것에 대해서는 그 근거를 반드시 확인한다.
- (3) 여기서 말하는 '근거'란 검사 결과 또는 제조기록으로부터의 추산값을 말한다.
- (4) 제조기록이 명확하지 않은 것은 '기재 없음'과 동일하게 취급한다.

4. 확인검사에 대해서

- (1) 확인검사는 정성검사법으로 실시한다. 웨스턴블롯법, PCR법, Real-time PCR법, PCR-핵산크로마토그래피 이외의 정성검사법을 사용할 수도 있으나 그 경우에는 상기 검사법들과 동등하거나 그 이상의 성능을 지닌 검사법을 사용해야 한다.
- (2) 알(卵), 유(乳)의 확인검사로 는 일반적으로 웨스턴블롯법이 사용된다. 이때 알(卵)의 경우에는 오보알부민항체 및 오보뮤코이드항체, 유(乳)의 경우에는 α-카제인항체 및 β-락토글로불린항체를 사용한다.
- (3) 밀, 메밀, 땅콩의 확인검사로 는 일반적으로 PCR법 또는 Real-time PCR법이 사용된다. PCR법에서는 특이적 유전자증폭밴드가 검출된 것을 양성으로 한다. Real-time PCR법에서는 산출된 Cq값이 기준 플라스미드용액의 평균 Cq값보다 작은 것을 양성으로 한다. 새우, 게의 확인검사로 는 일반적으로 PCR법이 사용된다. PCR법에서는 특이적 유전자증폭밴드가 검출된 것을 양성으로 한다. 호두의 확인검사로 는 일반적으로 Real-time PCR법 또는 PCR-핵산크로마토그래피가 사용된다. Real-time PCR 호두-H법에서는 산출된 Cq값이 기준 플라스미드용액의 평균 Cq값보다 작은 것을 양성으로 한다. 호두-N법에서는 Cq값이 얻어지는 것을 양성으로 한다. PCR-핵산크로마토그래피에서는 검사지의 특정 위치에 착색선이 확인되는 것을 양성으로 한다. 캐슈너트 확인 검사는 일반적으로 Real-time PCR법, PCR-핵산 크로마토그래피법 또는 LC-MS/MS법이 사용된다. Real-time PCR 캐슈너트-H법에서는 산출된 Cq 값이 기준 플라스미드 용액의 평균 Cq 값보다 작은 것을 양성으로 판정한다. 캐슈너트-N법에서는 Cq값이 얻어진 것을 양성으로 판정한다. PCR-핵산 크로마토그래피법에서는 테스트 스트립의 특정 위치에 착색 라인이 확인된 것을 양성으로 판정한다. LC-MS/MS 캐슈너트-NH법에서는 S/N비가 10을 초과한 것을 양성으로 판정한다. 캐슈너트-NS법 및 캐슈너트-HF법에서는 안정 동위체 표식 펩타이드에 대한 피크 면적비가 기준 이상인 것을 양성으로 판정한다.
- (4) 확인검사 시에는 선별 검사에서 사용한 것과 동일한 조제시료로부터 채취하여 사용한다. 두 번째 채취를 할 수 없는 경우에는 본 검사의 다른 검체를 사용하여 검사를 실시한다.

5. 위반 발견 시의 조치

- (1) 특정 원재료가 포함된 식품에 관한 표시가 개정되기까지(의사결정나무 branch⑪의 경우, 제조기록에 ‘표시 없음’의 근거가 기재되기까지), 해당 식품 등을 판매하지 않도록 지도한다.
- (2) 필요에 따라 식품위생법 제59조 또는 제60조의 규정에 따른 조치 등을 검토한다.

6. branch①~⑫까지의 개념

(알(卵), 유(乳), 밀, 메밀, 땅콩, 호두, 캐슈너트 감시에만 해당)

①	특정 원재료(알, 유(乳), 밀, 메밀, 땅콩, 호두, 캐슈너트)의 표시가 있고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 중 적어도 하나 이상이 ‘+ (양성)’인 경우
---	--

- 이 경우에도 제조기록을 확인하는 것이 좋으며 생략은 가능하다.

- 확인 검사는 필요 없다.
- 적정표시로 간주되어 행정조치는 필요 없다.

(새우, 게의 감시에만 해당)

②	특정 원재료(새우, 게)의 표시가 있고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 중 적어도 하나 이상이 ‘+ (양성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 있는 경우
---	---

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인 검사는 필요 없다.
- 적정표시로 간주되어 행정조치는 필요 없다.
- 새우 및 게의 감시에서 선별 검사로는 새우와 게를 구별할 수 없다는 점, 새우 및 게 이외의 갑각류 일부도 검출된다는 점에 유의해야 한다.

(새우, 게의 감시에만 해당)

③	특정 원재료(새우, 게)의 표시가 있고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 중 적어도 하나 이상이 ‘+ (양성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 없고 표시한 근거가 있는 경우
---	--

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 제조기록에 기재가 없음에도 불구하고 표시한 근거는 반드시 확인이 필요하다.
- 확인 검사는 필요 없다.
- 표시하는 것은 가능하며 행정조치는 필요 없다.
- 제조기록에 기재가 없음에도 불구하고 표시한 근거가 있다면 향후 그 근거를 제조기록에 기재하도록 지도한다.
- 새우 및 게의 감시에서 선별 검사로는 새우와 게를 구별할 수 없다는 점, 새우 및 게 이외의 갑각류 일부도 검출된다는 점에 유의해야 한다.

(새우, 게의 감시에만 해당)

④	특정 원재료(새우, 게)의 표시가 있고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 중 적어도 하나 이상이 ‘+ (양성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재와 표시한 근거가 없는 경우
---	---

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 원재료 기재란이 아닌 곳에 주의환기를 하는 것은 가능하다.
- 새우 및 게의 감시에서 선별 검사로는 새우와 게를 구별할 수 없다는 점, 새우 및 게 이외의 갑각류 일부도 검출된다는 점에 유의해야 한다.
- 필요한 경우 확인검사를 실시한다.

⑤	특정 원재료의 표시가 있고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과가 모두 ‘- (음성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 있는 경우
---	---

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인 검사는 필요 없다.
- 표시하는 것은 가능하며 행정조치는 필요 없다.
- 식품 중에 포함된 특정 원재료 등의 총단백질량이 수μg/mL의 농도수준 또는 수μg/g 함유수준에 미치지 못하는 경우에는 표시할 필요가 없지만 이 경우에 표시 여부에 대한 판단은 제조자 또는 판매자가 결정한다.
- 선별 검사 결과의 ‘- (음성)’은 특정 원재료의 총단백질량이 0(제로)이라는 의미는 아니라는 점에 유의해야 한다.

⑥	특정 원재료의 표시가 있고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과가 모두 ‘- (음성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 없는 경우
---	---

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인 검사는 필요 없다.
- 표시해서는 안 되며 표시를 정정한다.
- 제조기록에 기재가 없음에도 불구하고 표시한 근거가 있다면 향후 그 근거를 제조기록에 기재하도록 지도한다.

⑦	특정 원재료의 표시가 없고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 중 적어도 하나 이상이 ‘+ (양성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 있는 경우
---	--

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인 검사는 필요 없다.
- 표시는 필요하며 표시를 정정한다.
- 새우 및 게의 감시에서 선별 검사로는 새우와 게를 구별할 수 없다는 점, 새우 및 게 이외의 갑각류 일부도 검출된다는 점에 유의해야 한다.

⑧	특정 원재료의 표시가 없고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 중 적어도 하나 이상이 ‘+ (양성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 없고 확인검사 결과가 ‘+ (양성)’인 경우
---	---

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인검사가 반드시 필요하다.
- 확인검사 결과를 통해 선별 검사 결과가 위양성이 아닌 것이 확인되어 표시가 필요하며 표시를 정정한다.

단, 통상적으로 원재료로 취급하지 않는 것에 의한 오염으로 보이는 경우(예 : ‘메밀을 데친 물에 우동을 데친 경우에 그 데친 물’, ‘튀김이나 커틀릿 등의 튀김 기름’ 등)에는 기재란 외에 기재하여 주의환기를 하는 것이 좋다.

- 새우 및 게의 감시에서 선별 검사로는 새우와 게를 구별할 수 없다는 점, 새우 및 게 이외의 갑각류 일부도 검출된다는 점에 유의해야 한다.

⑨	특정 원재료의 표시가 없고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 중 적어도 하나 이상이 ‘+ (양성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 없고 확인검사 결과가 ‘- (음성)’인 경우
---	---

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인검사가 반드시 필요하다.
- 확인검사를 통해 선별검사 결과가 위양성이 아닌 것을 확인하지 못했으므로 표시를 정정하지 않는다.
- 그러나 확인검사 결과 ‘- (음성)’이 선별 검사 결과의 ‘+ (양성)’을 완전히 부정하는 것은 아니라는 점에 유의해야 한다.
- 원재료 기재란 이외에 기재하는 방법으로 주의환기를 할 수 있다.
- 새우 및 게의 감시에서 선별 검사로는 새우와 게를 구별할 수 없다는 점, 새우 및 게 이외의 갑각류 일부도 검출된다는 점에 유의해야 한다.

⑩	특정 원재료의 표시가 없고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 모두 ‘- (음성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 있고 미표시의 근거가 있는 경우
---	--

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인 검사는 필요 없다.
- 제조기록에 기재가 있음에도 불구하고 미표시한 근거에 대해서는 확인이 필요하다.
- 표시할 의무가 없고 적정표시이다.

⑪	특정 원재료의 표시가 없고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 모두 ‘- (음성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 있고 미표시의 근거가 없는 경우
---	--

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인 검사는 필요 없다.
- 제조기록에 기재가 있음에도 불구하고 미표시한 근거에 대해서는 확인이 필요하다.
- 표시하는 것이 바람직하다. 선별 검사 결과가 모두 ‘- (음성)’이므로 표시를 정정하지는 않지만 표시를 장려한다.
- 그러나 제조기록에 특정 원재료에 대한 기재가 있음에도 불구하고 미표시한 근거에 대해서는 제조기록 등에 반드시 기재하도록 지도한다. 선별 검사의 검사 결과를 미표시의

근거로 삼는 경우라 하더라도 자율적인 검사 결과는 근거로 인정하지만 행정검사상의 결과는 미표시의 근거로 인정되지 않는다.

⑫	특정 원재료의 표시가 없고 2종의 검사를 통한 선별 검사 결과 모두 ‘- (음성)’이며, 제조기록에 특정 원재료 기재가 없는 경우
---	--

- 제조기록을 반드시 확인한다.
- 확인 검사는 필요 없다.
- 적정표시로 간주되므로 미표시라 하더라도 문제가 없다.

표준품 규격

1. 알(卵) 검지용 표준액

1.1. 조제법

아래 제시한 방법에 따라 알 1차 표준액분말, 알 표준품 원액, 알 1차 희석액 및 알 고농도 표준액을 조제한다. 알 표준품 원액부터 알 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

알 1차 표준분말 조제방법

백색 레그혼종(산란계)의 신선란 1kg의 껍질을 벗겨 균질화한 후 동결건조한다. 건조물을 미분쇄하여 알 1차 표준분말로 사용한다.

알 표준품 원액 조제방법

알 1차 표준분말 0.2 g을 50 mL PP튜브에 채취하여 추출용 완충용액* 20 mL를 첨가하고 잘 흔들어 혼합하여 고형물을 분산시킨 후, 진탕기(90~110rpm)로 하룻밤 추출한다. 추출액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 직경 0.8μm의 마이크로필터로 여과해서 알 표준품 원액으로 사용한다.

추출 시에는 진탕기에 원심관을 가로로 세팅하여 흔들림 폭은 3cm 정도로 하고, 진동에 의하여 액체가 관의 양 끝에 부딪힐 정도의 진동횟수로 설정한다. 가끔 튜브의 상하를 바꾸는 조작을 하여 액면을 따라 부착되는 샘플을 분산시킨다.

* 추출용 완충용액 0.6% SDS 및 0.1M 아황산나트륨을 함유하는 PBS(pH 7.4).

알 1차 희석액 조제방법

알 표준품 원액을 pH 7.4의 PBS로 10배 희석하여 알 1차 희석액으로 사용한다.

알 고농도 표준액 조제방법

알 1차 희석액을 0.2% BSA가 포함된 pH 7.4의 PBS로 2배 희석하여 알 고농도 표준액으로 사용한다. 알 표준품 원액부터 알 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

1.2. 규격

알 표준품 원액 규격

전기영동 이미지

SDS-PAGE 전기영동을 실시하면 200, 130, 75, 40kDa 부근에서 각각 뚜렷한 밴드가 확인된다.

단백량

2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 단백질을 정량할 때, 그 농도는 4.1~6.2 mg/mL이다.

참고 아래 제시한 것은 참고값으로 한다.

알 1차 희석액의 단백질을 2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 정량한 농도는 알 표준품 원액 단백질 농도의 0.08~0.12배이다. 알 표준품 원액에 대해 SDS-PAGE를 실행하면 9.에 제시한 것과 같은 영동 이미지를 얻을 수 있다.

2. 우유 검지용 표준액

2.1. 조제법

아래 제시한 방법에 따라 우유 1차 표준액분말, 우유 표준품 원액, 우유 1차 희석액 및 우유 고농도 표준액을 조제한다. 우유 표준품 원액부터 우유 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

우유 1차 표준분말 조제방법

홀스타인종(젖소)의 신선유 1L를 얼음으로 냉각시키면서 교반하여 유지방이 응고되어 생기는 유지덩어리를 탈지면으로 여과한다. 이 조작을 3회 반복하여 지방을 제거한 후 여과액을 동결건조시키고 건조물을 미분쇄하여 우유 1차 표준분말로 사용한다.

우유 표준품 원액 조제방법

우유 1차 표준분말 0.2g을 50mL PP튜브에 채취하여 추출용 완충용액* 20mL를 첨가하고 잘 흔들어 혼합하여 고형물을 분산시킨 후, 진탕기(90~110rpm)로 하룻밤 추출한다. 추출액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 직경 0.8μm의 마이크로필터로 여과한 것을 우유 표준품 원액으로 사용한다.

추출 시에는 진탕기에 원심관을 가로로 세팅한다. 흔들림 폭은 3cm 정도로 하며 진동에 의하여 액체가 관의 양 끝에 부딪힐 정도의 진동횟수로 설정한다. 가끔 튜브의 상하를 바꾸는 조작을 하여 액면을 따라 부착되는 샘플을 분산시킨다.

* 추출용 완충용액 0.6% SDS 및 0.1M 아황산나트륨을 함유하는 PBS(pH 7.4).

우유 1차 희석액 조제방법

우유 표준품 원액을 pH 7.4의 PBS로 10배 희석하여 우유 1차 희석액으로 사용한다.

우유 고농도 표준액 조제방법

우유 1차 희석액을 0.2% BSA가 포함된 pH 7.4의 PBS로 2배 희석하여 우유 고농도 표준액으로 사용한다. 우유 표준품 원액부터 우유 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

2.2 규격

우유 표준품 원액 규격

전기영동 이미지

SDS-PAGE 전기영동을 실시하면 40~25kDa 범위에서 3줄, 16kDa 부근에서 1줄의 뚜렷한 밴드가 확인된다.

단백량

2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 단백질을 정량할 때, 그 농도는 2.1~3.2mg/mL이다.

참고 아래 제시한 것은 참고값이다.

우유 1차 희석액의 단백질을 2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 정량한 농도는 우유 표준품 원액 단백질농도의 0.08~0.12배이다. 우유 표준품 원액에 대해 SDS-PAGE를 실행하면 9.에 제시한 것과 같은 영동 이미지를 얻을 수 있다.

3. 밀 검지용 표준액

3.1 조제법

아래 제시한 방법에 따라 밀 1차 표준액분말, 밀 표준품 원액, 밀 1차 희석액 및 밀 고농도 표준액을 조제한다. 밀 표준품 원액부터 밀 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

밀 1차 표준분말 조제방법

아래 제시한 14가지 품종의 밀 혼합물을 분쇄하여 14매쉬의 체(aperture=1.18mm)에 통과시킨 것을 밀 1차 표준분말로 사용한다.

혼합물에 포함되는 품종

No.1 Canada Western Red Spring	7.14%
US No.2 or better (Dark) Northern Spring	7.14%
US Hard Red Winter - High Protein	7.14%
US Hard Red Winter - Semi Hard	7.14%
Canada Western Amber Durum - Triticum durum	7.14%
US Western White (White Club + Soft White)	7.14% (Club 1.6%)
Australian Premium White for Japan	7.14%
Australian Prime Hard	7.14%
호쿠신	7.14%
하루유타카	7.14%
농립61호	7.14%
치쿠고이즈미	7.14%

반도와세	7.14%
시로가네	7.14%

밀 표준품 원액 조제방법

밀 1차 표준분말 1g을 50mL PP관에 채취하여 추출용 완충용액* 20mL를 첨가하고 잘 흔들어 혼합하여 고형물을 분산시킨 후, 진탕기(90~110rpm)로 하룻밤 추출한다. 추출액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 직경 0.8μm의 마이크로필터로 여과한 것을 밀 표준품 원액으로 사용한다.

추출시에는 진탕기에 원심관을 가로로 세팅한다. 흔들림 폭은 3cm 정도로 하고 진동에 의하여 액체가 관의 양 끝에 부딪힐 정도의 진동횟수로 설정한다. 가끔 튜브의 상하를 바꾸는 조작을 하여 액면을 따라 부착되는 샘플을 분산시킨다.

* 추출용 완충용액 0.6% SDS 및 0.1M 아황산나트륨을 함유하는 0.1M Tris-HCl(pH 8.6)

밀 1차 희석액 조제방법

밀 표준품 원액을 pH 7.4의 PBS로 10배 희석하여 밀 1차 희석액으로 사용한다.

밀 고농도 표준액 조제방법

밀 1차 희석액을 0.2% BSA가 포함된 pH 7.4의 PBS로 2배 희석하여 밀 고농도 표준액으로 사용한다. 밀 표준품 원액부터 밀 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

3.2. 규격

밀 표준품 원액 규격

전기영동 이미지

SDS-PAGE 전기영동을 실시하면 32~120kDa 범위에서 네 줄의 이상의 밴드가 확인된다.

단백량

2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 단백질을 정량할 때, 그 농도는 4.0~6.0mg/mL이다.

참고 아래 제시한 것은 참고값이다.

밀 1차 희석액의 단백질을 2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 정량한 농도는 밀 표준품 원액 단백질농도의 0.08~0.12배이다. 밀 표준품 원액으로 SDS-PAGE를 실행하면 9.에 제시한 것과 같은 영동 이미지를 얻을 수 있다.

4. 메밀 검지용 표준액

4.1. 조제법

아래 제시한 방법에 따라 메밀 1차 표준액분말, 메밀 표준품 원액, 메밀 1차 희석액 및

메밀 고농도 표준액을 조제한다. 메밀 표준품 원액부터 메밀 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

메밀 1차 표준분말 조제방법

이바라키현산 및 중국산(중국 북방) 메밀을 등량혼합한 후 분쇄하여 14 매쉬의 체 (aperture=1.18 mm)에 통과시킨 것을 메밀 1차 표준분말로 사용한다.

메밀 표준품 원액 조제방법

메밀 1차 표준분말 1g을 50mL PP관에 채취하여 추출용 완충용액* 20mL를 첨가하고 잘 흔들어 혼합하여 고형물을 분산시킨 후, 진탕기(90~110rpm)로 하룻밤 추출한다. 추출액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 직경 0.8μm의 마이크로필터로 여과한 것을 메밀 표준품 원액으로 사용한다.

추출시에는 진탕기에 원심관을 가로로 세팅한다. 흔들림 폭은 3cm 정도로 하고 진동에 의하여 액체가 관의 양 끝에 부딪힐 정도의 진동횟수로 설정한다. 가끔 튜브의 상하를 바꾸는 조작을 하여 액면을 따라 부착되는 샘플을 분산시킨다.

* 추출용 완충용액 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨 및 0.5M 염화나트륨을 함유하는 20mM Tris-HCl(pH 7.5)

메밀 1차 희석액 조제방법

메밀 표준품 원액을 pH 7.4의 PBS로 10배 희석하여 메밀 1차 희석액으로 사용한다.

메밀 고농도 표준액 조제방법

메밀 1차 희석액을 0.2% BSA가 포함된 pH 7.4의 PBS로 2배 희석하여 메밀 고농도 표준액으로 사용한다. 메밀 표준품 원액부터 메밀 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

4.2 규격

메밀 표준품 원액 규격 전기영동 이미지

SDS-PAGE 전기영동을 실시하면 22kDa 부근에서 한 줄의 뚜렷한 밴드와 32kDa~83kDa 범위에 네 줄 이상의 밴드가 확인된다.

단백량

2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 단백질을 정량할 때, 그 농도는 2.7~4.0mg/mL이다.

참고 아래 제시한 것은 참고값이다.

메밀 1차 희석액의 단백질을 2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로

정량한 농도는 메틸 표준품 원액 단백질농도의 0.08~0.12배이다. 메틸 표준품 원액으로 SDS-PAGE를 실행하면 9.에 제시한 것과 같은 영동 이미지를 얻을 수 있다.

5. 땅콩 검지용 표준액

5.1. 조제법

아래 제시한 방법에 따라 땅콩 1차 표준액분말, 땅콩 표준품 원액, 땅콩 1차 희석액 및 땅콩 고농도 표준액을 조제한다. 땅콩 표준품 원액부터 땅콩 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

땅콩 1차 표준분말 조제방법

지바현산 버지니아종 땅콩을 막자사발에 분쇄하여 페이스트 상태로 만든 것 1g을 50mL PP관에 채취하여 아세톤 10mL를 첨가하여 교반기로 1분간 교반한 후, 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거한다. 이 조작을 3회 반복한다. 튜브를 45℃의 히팅블럭에 세팅하여 약 7시간 동안 건조한 것을 땅콩 1차 표준분말로 사용한다.

땅콩 표준품 원액 조제방법

땅콩 1차 표준분말 0.4g에 추출용 완충용액* 20mL를 첨가하고 잘 흔들어 혼합하여 고형물을 분산시킨 후, 진탕기(90~110rpm)로 하룻밤 추출한다. 추출액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 직경 0.8μm의 마이크로필터로 여과한 것을 땅콩 표준품 원액으로 사용한다.

추출 시에는 진탕기에 원심관을 가로로 세팅한다. 흔들림 폭은 3cm 정도로 하고, 진동에 의하여 액체가 관의 양 끝에 부딪힐 정도의 진동횟수로 설정한다. 가끔 튜브의 상하를 바꾸는 조작을 하여 액면을 따라 부착되는 샘플을 분산시킨다.

* 추출용 완충용액 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨 및 0.5M 염화나트륨을 함유하는 20mM Tris-HCl(pH 7.5)

땅콩 1차 희석액 조제방법

땅콩 표준품 원액을 pH 7.4의 PBS로 10배 희석하여 땅콩 1차 희석액으로 사용한다.

땅콩 고농도 표준액 조제방법

땅콩 1차 희석액을 0.2% BSA가 포함된 pH 7.4의 PBS로 2배 희석하여 땅콩 고농도 표준액으로 사용한다. 땅콩 표준품 원액부터 땅콩 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

5.2. 규격

땅콩 표준품 원액 규격

전기영동 이미지

SDS-PAGE 전기영동을 실시하면 70kDa 부근에서 한 줄의 뚜렷한 밴드와 15kDa~30kDa 범위에 3~4줄의 뚜렷한 밴드가 확인된다.

단백량

2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 단백질을 정량할 때, 그 농도는 3.2~4.8mg/mL이다.

참고 아래 제시한 것은 참고값이다.

땅콩 1차 희석액의 단백질을 2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 정량한 농도는 땅콩 표준품 원액 단백질농도의 0.08~0.12배이다. 땅콩 표준품 원액으로 SDS-PAGE를 실행하면 9.에 제시한 것과 같은 영동 이미지를 얻을 수 있다.

6. 갑각류 검지용 표준액

* 새우, 게의 선별에 사용하는 ELISA 키트로 새우와 게의 구별 없이 검출되므로 본 표준액의 명칭은 갑각류 검지용 표준액으로 한다.

6.1. 조제법

아래 제시한 방법에 따라 갑각류 1차 표준분말, 갑각류 표준품 원액, 갑각류 1차 희석액 및 갑각류 고농도 표준액을 조제한다. 갑각류 표준품 원액부터 갑각류 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

갑각류 1차 표준분말 조제방법

얼룩새우(블랙타이거)(양식새우)의 꼬리부분 근육을 채취하여 얼음으로 냉각시키면서 균질화한 후 동결건조한다. 건조물을 미분쇄하여 갑각류 1차 표준분말로 사용한다.

갑각류 표준품 원액 조제방법

갑각류 1차 표준분말 0.1g을 50mL PP관에 채취하여 추출용 완충용액* 20mL를 첨가하고 잘 흔들어 혼합하여 고형물을 분산시킨 후, 진탕기(90~110rpm)로 하룻밤 추출한다. 추출액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 직경 0.8μm의 마이크로필터로 여과한다. 이 여과액을 100℃에서 10분간 가열하여 갑각류 표준품 원액으로 사용한다.

추출 시에는 진탕기에 원심관을 가로로 세팅하고, 흔들림 폭은 3cm 정도로 하며 진동에 의하여 액체가 관의 양 끝에 부딪힐 정도의 진동횟수로 설정한다. 가끔 튜브의 상하를 바꾸는 조작을 하여 액면을 따라 부착되는 샘플을 분산시킨다.

* 추출용 완충용액 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨, 1% Inhibitor Cocktail 및 5mM EDTA(Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit(Thermo Fisher Scientific사))를 함유하는 PBS(pH 7.4)

갑각류 1차 희석액 조제방법

갑각류 표준품 원액을 pH 7.4의 PBS로 10배 희석하여 갑각류 1차 희석액으로 사용한다.

갑각류 고농도 표준액 조제방법

갑각류 1차 희석액을 0.2% BSA가 포함된 pH 7.4의 PBS로 2배 희석하여 갑각류 고농도 표준액으로 사용한다. 갑각류 표준품 원액부터 갑각류 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

6.2. 규격

갑각류 표준품 원액 규격 전기영동 이미지

SDS-PAGE 전기영동을 실시하면 160, 41, 37kDa 부근에서 각각 1줄, 20~16kDa 범위에서 4줄의 뚜렷한 밴드가 확인된다.

단백량

2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 단백질을 정량할 때, 그 농도는 2.7~4.1mg/mL이다.

참고 아래 제시한 것은 참고값이다.

갑각류 1차 희석액조제 단백질을 2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 정량한 농도는 갑각류 표준품 원액 단백질농도의 0.08~0.12배이다. 갑각류 표준품 원액으로 SDS-PAGE를 실행하면 9.에 제시한 것과 같은 영동 이미지를 얻을 수 있다.

7. 호두 검지용 표준액

7.1 조제법

아래 제시한 방법에 따라 호두 1차 표준액분말, 호두 표준품 원액, 호두 1차 희석액 및 호두 고농도 표준액을 조제한다. 호두 표준품 원액부터 호두 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

호두 1차 표준분말 조제방법

채들러종 호두를 막자사발로 분쇄한 것 3g을 50mL PP 튜브에 채취하여 아세톤 30mL를 첨가하여 교반기로 1분간 교반한 후, 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거한다. 이 조작을 3회 반복한다. 튜브를 45℃의 히팅블럭에 세팅하여 약 7시간 동안 건조한 후 500μm의 체에 통과시킨 것을 호두 1차 표준분말로 사용한다.

호두 표준품 원액 조제방법

호두 1차 표준분말 0.1g을 50mL PP관에 채취하여 추출용 완충용액* 20 mL를 첨가하고 교반기로 1분간 교반하여 고형물을 분산시킨 후, 진탕기(90~110rpm)로 하룻밤 추출한다. 추

출액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 직경 0.8μm의 마이크로필터로 여과한 것을 호두 표준품 원액으로 사용한다.

추출 시에는 진탕기에 원심관을 가로로 세팅한다. 흔들림 폭은 3cm 정도로 하고, 진동에 의하여 액체가 관의 양 끝에 부딪힐 정도의 진동횟수로 설정한다. 가끔 튜브의 상하를 바꾸는 조작을 하여 액면을 따라 부착되는 샘플을 분산시킨다.

* 추출용 완충용액 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨, 0.05% Tween20을 함유하는 120mM Tris-HCl (pH 7.5)

호두 1차 희석액 조제방법

호두 표준품 원액을 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨을 포함하는 pH 7.4의 PBS로 10배 희석하여 호두 1차 희석액으로 사용한다.

호두 고농도 표준액 조제방법

호두 1차 희석액을 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨, 0.2% BSA를 포함하는 pH 7.4의 PBS로 2배 희석하여 호두 고농도 표준액으로 사용한다. 호두 표준품 원액부터 호두 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 내에 실시한다.

7.2. 규격

호두 표준품 원액 규격

전기영동 이미지

SDS-PAGE 전기영동을 실시하면 10Da 부근에서 1줄, 23kDa~18kDa 및 35kDa~30kDa 범위에서 각각 2줄의 뚜렷한 밴드가 확인된다.

단백량

2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 단백질을 정량할 때, 그 농도는 1.9~2.9mg/mL이다.

참고 아래 제시한 것은 참고값이다.

호두 1차 희석액 조제 단백질을 2-D Quant kit(Global Life Science Technologies Japan사)로 정량한 농도는 호두 표준품 원액 단백질농도의 0.08~0.12배이다. 호두 표준품 원액으로 SDS-PAGE를 실행하면 9.에 제시한 것과 같은 영동 이미지를 얻을 수 있다.

8. 캐슈너트 검지용 표준액

8.1. 조제법

아래에 제시된 방법에 따라 캐슈너트 1차 표준 분말, 캐슈너트 표준품 원액, 캐슈너트 1차 희석액, 캐슈너트 고농도 표준액을 조제한다. 캐슈너트 표준품 원액에서 캐슈너트 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 이내에 수행한다.

캐슈너트 1차 표준 분말 조제법

베트남산 캐슈너트를 절구로 분쇄한 것 3g을 50mL PP 튜브에 넣고 아세톤 30mL를 첨가한 뒤, 볼텍스 믹서를 사용하여 1분간 교반한 후, 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거한다. 이 조작을 3회 반복한다. 튜브를 45℃의 알루미늄 수조에 올려 약 7시간 건조한 후, 500 μm 체를 통과한 것을 캐슈너트 1차 표준 분말로 한다.

캐슈너트 표준품 원액 조제법

캐슈너트 1차 표준 분말 0.1 g을 50 mL PP 튜브에 채취하고, 추출용 완충액* 20 mL를 넣어 볼텍스 믹서를 사용하여 1분간 교반하여 고형물을 분산시킨 후, 진탕기(90~110 rpm)에서 하룻밤 동안 추출한다. 추출액을 10,000×g에서 30분간 원심 분리한 후, 상층액을 구멍 크기 0.8 μm의 마이크로 필터로 여과하여 캐슈너트 표준 원액으로 한다.

추출 시에는 진탕기에 원심관을 얹혀 놓는다. 진탕 폭은 3 cm 정도로 하고, 진탕으로 인해 액체가 양쪽 끝에 부딪힐 정도의 진탕 횟수로 한다. 때때로 튜브의 상하를 뒤집는 등의 조작을 하여, 액면을 따라 부착된 시료를 분산 시킨다.

* 추출용 완충액 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨, 0.05% Tween20을 함유하는 120 mM Tris-HCl (pH 7.5)

캐슈너트 1차 희석액 조제법

캐슈너트 표준품 원액을 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨을 함유한 pH 7.4의 PBS로 10배 희석하여 캐슈너트 1차 희석액으로 한다.

캐슈너트 고농도 표준액 조제법

캐슈너트 1차 희석액을 0.6% SDS, 0.1M 아황산나트륨, 0.2% BSA를 함유한 pH 7.4의 PBS로 2배 희석하여 캐슈너트 고농도 표준액으로 한다. 캐슈너트 표준품 원액에서 캐슈너트 고농도 표준액 조제까지의 조작은 1일 이내에 수행한다.

8.2. 규격

캐슈너트 표준품 원액 규격

전기영동 이미지

SDS-PAGE를 이용한 전기영동을 수행할 때, 10 kDa, 19 kDa, 26 kDa 및 35 kDa 부근에 각각 1개의 뚜렷한 밴드가 관찰된다.

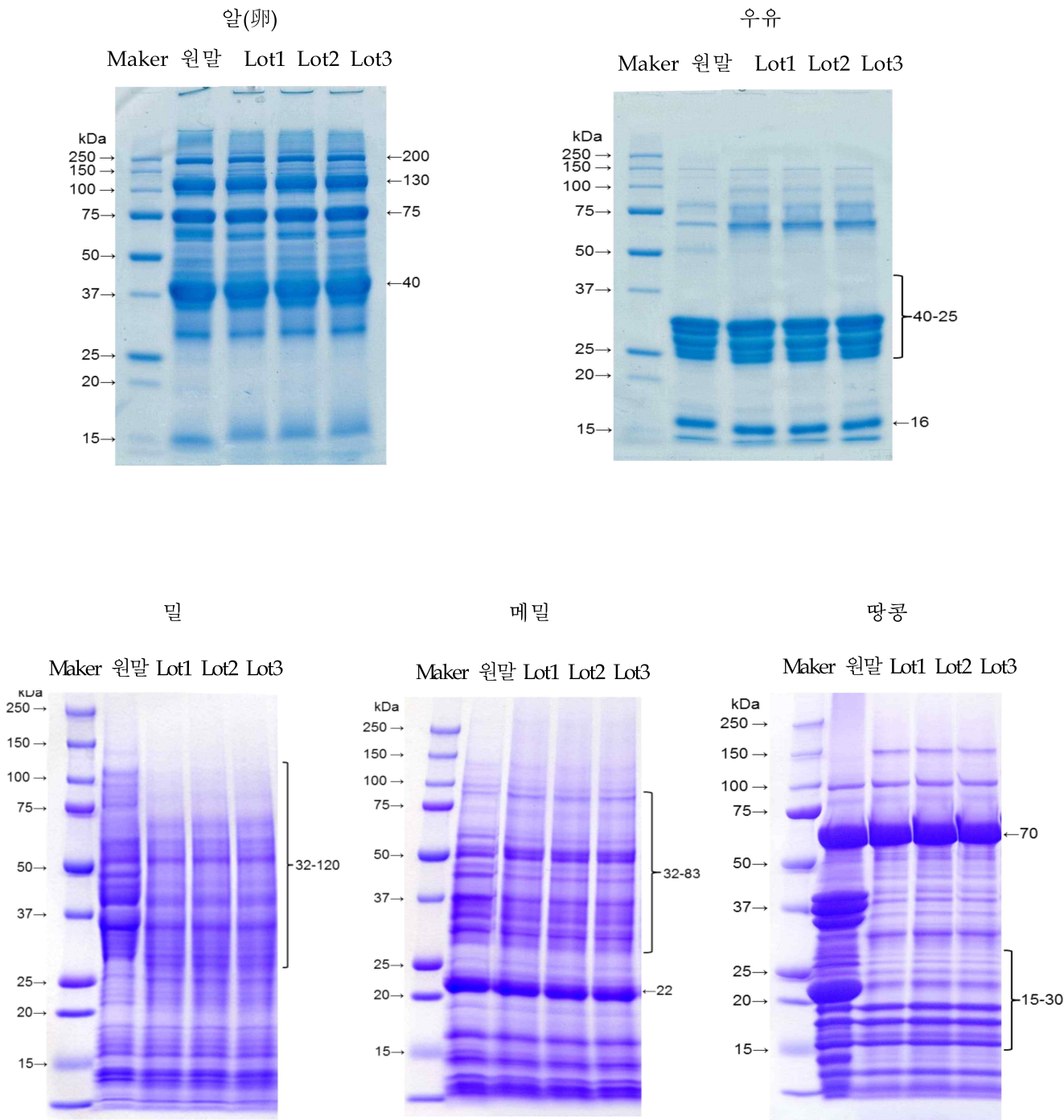
단백질 양

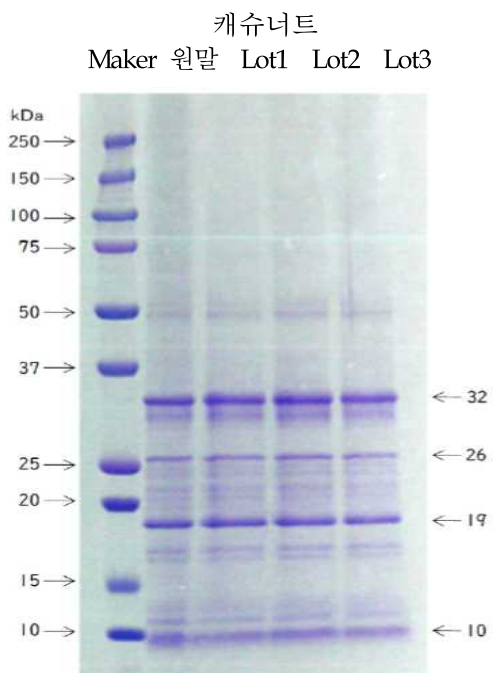
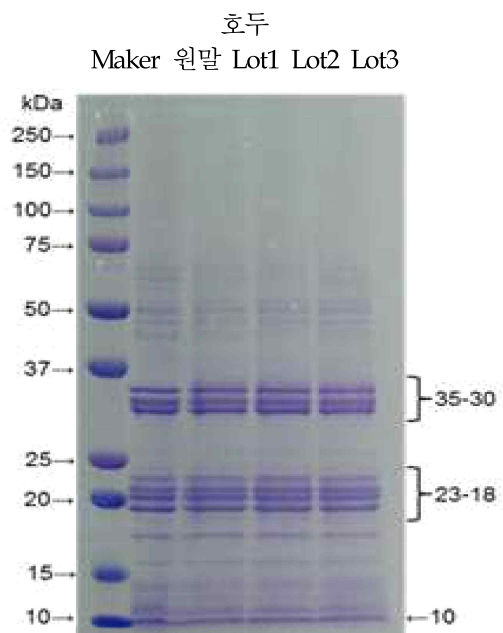
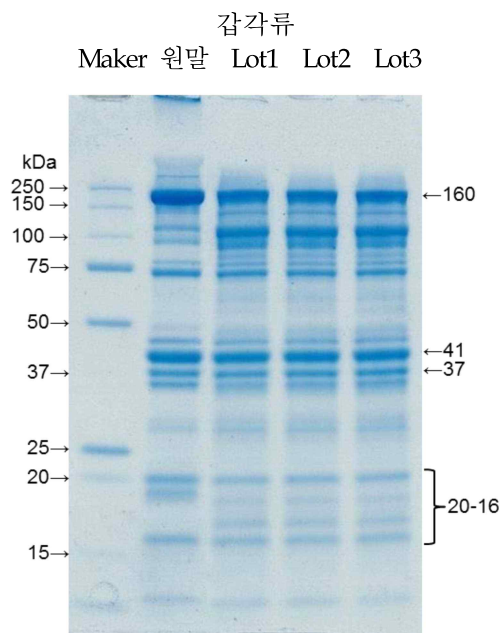
2-D Quant kit(Global Life Sciences Technologies Japan사 제조)를 이용하여 단백질을 정량할 때, 그 농도는 1.5~2.1 mg/mL이다.

참고: 아래에 제시된 값은 참고값으로 한다.

캐슈너트 1차 희석액 조제 단백질을 2-D Quant kit(Global Life Sciences Technologies Japan사 제조)를 이용하여 정량할 때, 그 농도는 캐슈너트 표준품 원액의 단백질 농도의 0.08배~0.12배이다. 캐슈너트 표준품 원액에 대해 SDS-PAGE를 수행할 때, 9.에 나타난 것과 같은 전기영동 이미지를 얻을 수 있다.

9. 각 표준품 원액의 SDS-PAGE 전기영동 이미지





원말: 알(卵) · 우유 · 밀 · 메밀 · 땅콩 · 감각류 · 호두 · 캐슈너트 표준분말
 Lot1-3: 로트번호

(별첨 4)

알레르겐을 함유하는 식품의 검사방법 평가에 관한 가이드라인

머리말

최근 식품으로 인한 알레르기가 증가하고 있으며 위중한 증상을 일으키는 경우도 많다. 이에 따라 2001년 4월부터 알레르기 유발물질(알레르겐)을 함유하는 식품에 관한 표시제도가 창설되었다.

본 표시제도가 적절하게 실천되고 있음을 검증하기 위해서는 특정 원재료를 함유하는 식품의 검사방법이 필요하다. 2002년 11월에 <알레르기물질을 함유하는 식품의 검사방법에 대해서>가 통지되어 특정 원재료 5품목의 검사방법이 정해졌다. 또한 2005년 11월에는 추가적인 검사방법이 통지되었다. 그러나 그 후의 연구에 의한 기술 향상 및 새로운 알레르기 유발물질의 발견 등에 따라, 소비자 보호를 위하여 검사방법에 관한 지속적인 재검토가 필요하게 되었다. 또한 부적절한 검사방법으로 인한 건강피해를 일으키지 않기 위해서도 검사기술에 대한 평가도 실시해야 한다. 검사기술을 평가하는 방법으로는 많은 분야에서 분석법의 밸리데이션이 확립되어 있으나, 식품 속의 알레르기 유발물질 검사라는 특성상 기존 분석법의 평가방법만으로는 적절한 평가가 어렵다고 판단되어 가이드라인을 작성하여 알레르기 표시 검증에 사용하기 적절한 검사방법에 대한 평가방법을 정하게 되었다. 본 가이드라인에서는 알레르기 식품의 검사법에 대한 평가방법, 표시제도 검증을 위한 검사방법에 요구되는 특성, 검사법 시행자가 해야 하는 신뢰성 확보에 관한 지침을 제시한다.

1. 식품 속의 특정 원재료에 대한 검사방법

1.1. 정량검사법(효소면역측정법(ELISA법))

항원으로 동물의 면역반응을 일으켜 항체를 만들고 그 항체에 대한 결합량으로부터 시료 중의 항원량을 정량하는 방법이다. 현재 개발되어 있는 방법으로는 대상 식품에 함유된 다양한 단백질에 대한 항체를 사용하는 방법과 특정 단백질에 대한 항체를 사용하는 방법이 있다. 또한 후자로는 다클론 항체와 단클론 항체 중 하나를 사용하는 방법을 고려할 수 있다. 항체 선택에 따라 선택성, 교차반응성, 검출 하한값, 식품에 대한 적용성이 달라진다. 특정 단백질에 친화성이 높은 항체를 사용하면 특이성은 높아지지만 식품 가공에 의해 대상 단백질이 변성되는 경우에는 검출되지 않을 가능성이 있다. 또한 원재료의 일부만을 사용한 경우, 해당 부분에 대상 단백질이 함유되어 있지 않다면 검출되지 않기 때문에 위음성이 증가한다. 한편 다양한 단백질과 결합하는 항체를 사용하면 위와 같은 문제를 방지할 수 있으나, 대상 식품 이외의 식품에서 유래한 단백질과의 결합이 많아져 위양성 결과가 발생할 확률이 높아진다.

1.2. 정성검사법(웨스턴블롯법, 중합효소연쇄반응법(PCR법))

웨스턴블롯법은 단백질을 전기영동으로 분리한 후, 항원항체반응으로 검출하는 방법이다. 특정 단백질에 대한 항체를 사용하며 밴드가 나타나는 위치에 따라 분자량에 관한 정보를

얻을 수 있어, 효소면역측정법보다도 특이성이 높아 위양성이 나타나기 어렵다.

현행 통지에서는 이러한 특성 때문에 알(卵)과 유(乳)의 확인검사법으로 규정되어 있다. 웨스턴블롯법에서는 육안으로 밴드를 확인하기 때문에 정량검사법은 되지 못하고, 정성검사법으로서의 밸리데이션이 필요하다.

PCR법은 항원성을 나타내는 식품에 특이적인 DNA 영역을 PCR로 증폭하여 검출하는 방법이다. 적절한 영역을 설정한다면 특이성이 높아 현행 통지에서는 밀, 메밀, 땅콩의 확인 검사로 규정되어 있다. 한편 닭고기와 계란은 DNA가 동일하기 때문에 PCR로 구별하기가 어렵다.

이상의 특성으로 인해 현재 알레르기 유발물질을 함유하는 식품의 검사방법으로는 선별 검사로 정량검사법을 사용하고 확인을 위해 정성검사법을 사용하고 있다.

2. 검사방법의 평가

2.1. 정량검사법의 평가기준

정량법의 평가기준이 되는 성능 파라미터는 Codex 또는 일본약국방(日本藥局方) 등에 제시되어 있다. ISO, Codex, 일본약국방 등에 정의된 내용은 각각 조금씩 다르나, 표 1에 제시된 양을 사용하여 성능이 평가된다. 대상 검사법의 사용목적에 따라 적절한 파라미터를 선택하여 평가한다. 일반적으로 정확도(회수율), 정밀도(병행, 실내재현정밀도)는 검사법의 목적과 상관없이 반드시 확인해야 한다. 잔류 수준 검사에서는 정량하한, 검출하한이 중요하며 대상물질의 예상농도가 크게 달라지는 경우에는 검사를 적용할 수 있는 범위가 중요한 파라미터가 된다.

이러한 파라미터는 밸리데이션에 의하여 결정된다. 많은 경우에 실험계획법에 따른 반복 시험을 통해 통계적으로 추정되기 때문에 밸리데이션에 참가하는 기관의 수, 사용하는 시료의 수 등에 따라 얻어지는 파라미터의 신뢰성이 달라진다.

표 1 성능 파라미터

정확도	정밀도(반복성, 실내재현정밀도, 실간재현정밀도)
특이성	검출한계
직선성	정량한계
범위	완건성(robustness)

2.2. 정성검사법의 평가기준

정성법에서는 정량과 같이 수치로 표시되는 결과는 얻을 수 없기 때문에 정량법의 파라미터를 그대로 적용할 수는 없다. 정확도와 정밀도를 합한 개념으로는 정답률, 위양성을, 위음성을 등을 생각할 수 있다. 또한 농도가 낮아지면 판정이 부정확해지므로 정확하게 판정할 수 있는 한계농도 역시 중요한 성능 파라미터이다.

2.3. 실험실간 밸리데이션

실험실간 밸리데이션은 다수의 실험실에서 공통의 시료를 분석하고 그 결과를 통계적으로 해석함으로써 정확도, 반복성, 재현성을 평가하는 것이다. Codex에서도 실험실간 밸리데이션으로 성능이 확인되어 공표된 방법이 채택된다. AOAC INTERNATIONAL의 OMA(Official method of analysis)는 실험실간 밸리데이션으로 평가된 분석법이다. AOAC에서는 실험실간 밸리데이션을 collaborative study라 부르며 프로토콜이 정해져 있다. ISO5725(JIS Z8402)에도 거의 동일한 프로토콜이 제시되어 있다.

Collaborative study에서는 정확도(회수율), 반복성, 재현성이 평가된다. 또한 다수의 실험실에서 실시하므로 완전성도 보증할 수 있다. 정량법인 Collaborative study의 실시요건은 다음과 같다.

시료 수 5, 실험실 수 8, 반복횟수 1 또는 2

Collaborative study 전에 1곳의 실험실에서 완전성을 포함해서 다음과 같은 성능평가를 실시한다.

- 검량선 분석법을 사용할 수 있는 농도범위를 결정한다. 직선일 필요는 없다.
- 특이성 존재가 예상되는 물질의 방해 정도.
- 편차(정확도) 첨가회수율로부터 계통오차를 추정한다.
- 기기의 성능, 분석계통의 안정성을 특정한다.
- 정밀도 반복성, 실내정밀도, 완전성
- 기존 방법과의 비교

실험실 내 성능평가가 허용되는 경우에 한하여 Collaborative study를 실시한다.

2.4. 심층검토(peer review)

사전에 개발자가 성능평가를 실시한 후 제삼자기관이 그 성능을 확인하는 방법을 심층검토라 한다. 실험실간 밸리데이션과는 달리 재현성은 필요 없다. 심층검토를 실시하기 위해서는 사전에 다음과 같이 분석성능을 평가한다.

- 검량선
정량검사법에서는 최소 5농도(0을 포함하지 않는다). 직선일 필요는 없다. 표준용액과 매트릭스를 둘 다 제시한다.
정성검사법에서는 음성대조군을 포함하는 시료로 정성범위를 확인한다. 각각의 농도에서 5~10회 반복하여 각 농도의 양성율을 플롯(plot)한다.
- 적용할 수 있는 매트릭스
적용 가능한 매트릭스를 명시한다.
- 정확도
정량법에서는 적절한 범위의 농도를 첨가한 시료의 회수율을 정확도의 지표로 한다.
6개의 시료에서 각각 3농도의 회수율을 제시한다.
정성법에서는 기존의 방법과 비교한다.

- 정밀도
정량법에서는 서로 다른 날짜, 분석자, 검량선, 시약, 매트릭스 간의 RSD를 제시한다. 정성법에서는 몇 가지 농도에서의 정답률, 위양성, 위음성률로 나타낸다.
- 기존 방법과의 비교
가능하면 기존 방법(밸리데이션을 통과한 방법이 좋다)과 비교하는 것을 강력히 권장한다.
- 교차반응성
유사물질, 대사물, 매트릭스 중에 존재할 가능성이 있는 성분에 대한 반응성.
- 안정성
시간, 온도, 동결 및 용해 사이클에 대한 키트 각 부의 완전성을 평가한다.
- 검출한계
정량검사법에서는 매트릭스 대조군의 평균값 + 3 표준편차를 분석대상의 농도로 변환한다.
- 정량한계
매트릭스마다 적어도 6개의 첨가샘플을 실제로 분석하여 결정한다.
- 위양성 · 위음성을
정성검사법에 적용된다.
- 완전성
시험환경에서 일어날 수 있는 미세한 변화에 의한 시험계통의 변동 정도에 관한 시험.

2.5. 단일실험실의 밸리데이션(single laboratory validation)

실험실간 시험 전에 분석법의 실행가능성을 확인한다. 공동시험 데이터를 얻을 수 없거나 정식 공동시험을 하는 것이 현실적이지 않을 경우에 분석법의 신뢰성에 관한 증거를 제공한다. 이미 밸리데이션을 통과한 방법이 올바르게 사용되고 있다는 것을 보증하는 등의 목적을 위해 1개의 실험실에서 밸리데이션을 실시한다. 이 밸리데이션에 대해서는 IUPAC의 기술보고에 조정 가이드라인이 제공되어 있다. 해당 가이드라인의 권고사항에는

- 가능하고 현실적이라면 국제적 프로토콜에 적합한 공동시험을 통해 성능이 평가된 분석법을 사용한다.
- 그와 같은 분석법이 없는 경우에는 고객에게 분석데이터를 제공하기 전에 실험실 내에서 분석법을 검증한다.
- 단일실험실의 밸리데이션에서는 다음 중 적절한 성능을 선택하여 평가한다 : 적용성, 특이성, 정확도, 정밀도, 범위, 정량하한, 검출하한, 감도, 완전성. 이 중 어느 성능을 선택할지는 고객의 요구를 고려하여 결정한다.
- 위 성능이 평가되었다는 증거를 고객이 요구하는 경우에 사용할 수 있도록 해둔다.
라고 되어 있다.

2.6. 특정 원재료 검출방법 평가 시의 문제점

항체를 이용한 효소면역측정법(ELISA법) 또는 웨스턴블롯법은 특정 원재료 단백질의 검

출범으로 많이 사용되고 있는데 다른 기기분석에는 없는 문제가 있다. 대부분의 이화학검사, 미생물검사는 분석대상물의 물성과 구조가 명확하다. 이 물성과 구조에 관한 정보를 토대로 적절한 방법을 선택하여 분석법을 결정하게 된다. 한편 식품 알레르기 유발물질 검출법은 대상물이 하나로 정해지지 않는다. 예를 들어 알(卵)을 검출하는 경우, 식품표시는 알 전체를 포함하는지의 여부를 나타내게 되지만, 검출 대상은 알의 모든 단백질, 알에 특이적으로 함유되어 있는 특정 단백질, 항원성을 지닌 난류 단백질, 달걀의 유전자 등이 있을 수 있다. 모든 단백질을 대상으로 하는 경우에는 그 본질이 분명하지 않다. 반면에 특정 단백질을 대상으로 하는 경우에는 물성은 명확하지만 표시대상인 알 전체 또는 항원성을 지닌 단백질과의 양적 관계를 명확히 할 필요가 있다. 결과 판정을 위해서는 적어도 검량선에 사용하는 표준 단백질의 성질을 명확히 해야 한다. 표시는 특정 원재료인 단백질 전체를 대상으로 하기 때문에 표준단백질은 특정단백질이나 항원성을 지닌 단백질이 아닌, 되도록 모든 단백질을 포함하고 있는 것이 바람직하다.

가열과 같은 가공처리에 의한 단백질의 변성도 중요한 문제가 된다. 표시제도의 대상이 되는 것은 모든 가공식품이며 해당 식품에 함유된 특정 원재료 단백질은 가공과정에서 다양한 정도의 변성을 입는다. 그 결과, 사용되는 항체와의 결합이 달라진다. 또한 DNA를 검출하는 방법에서는 증폭 부위의 절단이 변동의 원인이 된다. 따라서 키트에 사용되는 항체가 다르면 동일 검체에서도 다른 결과가 나오는 것이 당연하다. 표시 확인을 위한 검사법은 높은 정확도 보다는 넓은 범위의 식품에 용인될 수 있을 정도의 정확도를 지니는 것이 중요하다. 변성, 방해로 인해 정확도가 100%보다 훨씬 크거나 작은 경우가 있는 것은 어쩔 수 없지만, 검사의 신뢰성을 높이기 위해서는 가능한 한 이와 같은 정보를 공표해야 한다.

정확도를 평가하기 위해서는 표준품이 필요하다. 별첨 3에 제시된 표준품 규격에 적합한 표준품을 사용한다. 다른 표준품을 사용하는 경우에는 그 제작법과 성질을 명시하고 시험결과를 올바르게 해석하기 위하여 현행 표준과의 차이를 명확히 해둘 필요가 있다.

3. 실험실에서의 신뢰성 보증

높은 성능이 보증된 검사법을 채택하더라도 실험실에서의 실시방법이 미비하여 검사 결과가 부정확해지는 요인이 몇 가지 있을 수 있다. 이와 같은 문제는 다른 식품분석과 마찬가지로 각 검사기관의 신뢰성 확보 시스템을 통해 대응해야 한다.

3.1. 시험 도입 시의 밸리데이션

실험실에서 새롭게 식품 속의 알레르기 유발물질 검사를 시작할 때는 성능이 평가되고 공표된 검사법을 도입해야 한다. 또한 도입 시에는 단일실험실 밸리데이션을 실시하여 공표된 검사법(키트)의 성능을 달성할 능력이 있는지 확인해야 하며, 적어도 정밀도(반복성, 실험실내정밀도), 편향을 확인한다. 공표된 데이터와의 차이가 큰 경우에는 3.3에 제시한 기법관리를 참고하여 절차를 수정해야 한다.

3.2. 내부정밀도 관리

식안감발(食安監發) 제0323003호(2004년 3월 23일) 별지, 등록검사기관의 제품검사에 관한 업무관리 영역에서는 검사 기능을 일상적으로 평가하기 위해 정밀도 관리(내부정밀도 관리)를 실시해야 한다고 규정되어 있다. 도입 시의 편향, 실내정밀도 등이 유지되고 있다는 것을 증명하기 위해서라도 적절한 관리시료를 사용하여 내부정밀도 관리를 실시하는 것이 좋다.

3.3. 기법 관리

샘플링

가공식품 중에는 극도로 불균일한 것이 많고 샘플링 및 시료조제 단계에서 큰 변동의 원인이 존재할 수 있으므로 표준적인 샘플링 절차를 확립하는 것이 필요하다.

분석기기

대부분의 경우에 농도와 측정값의 관계에 3차곡선 또는 4-parameter logistic curve 등을 대입하여 검량선을 작성한다. 4-parameter logistic curve는 비선형이므로 초기값 및 수렴의 판정기준이 부적절하면 올바른 검량선 함수를 얻을 수 없다. 이와 같은 경우에는 분석값에 큰 오차가 발생할 수 있다.

플레이트리더에서의 위치에 의한 흡광도의 편중이나 피펫에 의한 주입량의 불규칙함은 반복성에 크게 영향을 주므로 사용하는 기기를 일상적으로 점검하는 것도 중요하다.

정밀도의 구조

알레르기 유발물질 검사에 사용되는 샌드위치 효소면역측정법의 경우, 방해가 없는 상황에서 달성할 수 있는 반복성(웰간의 편차)은 마이크로피펫에 의한 액체주입의 오차, 플레이트 웰간의 흡광도 편차 등으로부터 다음 식을 통해 계산할 수 있다.

$$\rho_T^2 = \rho_X^2 + \rho_S^2 + \left(\frac{\sigma_W}{f(X)} \right)^2$$

ρ_T : 측정값의 RSD

ρ_X : 분석대상물질 주입량의 RSD(피펫의 편차)

ρ_S : 반응기질용액량의 편차가 흡광도 측정값의 편차에 미치는 영향

$\rho_S = (\text{피펫에 의한 주입량의 RSD}) \cdot (2/3)$.

σ_W : 웰 자체의 흡광도 SD(웰간 흡광도의 SD)

$f(X)$: 흡광도를 나타내는 검량선(X는 분석대상물질의 농도)

전형적인 값으로 $\rho_X = 0.6\%$, $\rho_X = 0.4\%$, $\sigma_W = 0.004\text{Abs}$ 로 설정하면, 효소면역측정법 키트로 정량한 흡광도 범위 0.2~1.5에서 RSD는 1~5%정도이다. 실제 검사에서 표준액 또는 동일 시험용액을 반복적으로 측정한 경우에 흡광도 1 부근의 RSD가 5%를 크게 초과하는 경우에는 피펫 주입의 정밀도, 플레이트 세정 조작, 플레이트리더의 위치 조절 등에 이상이 있을 수 있으므로 원인을 규명하여 정밀도를 향상시켜야 한다.

4. 특정 원재료 검출법의 개발자가 공표해야 하는 검사방법의 성능과 그 범위에 관한 제언

효소면역측정법, 웨스턴블롯법, PCR법 등의 특정 원재료 검사방법을 개발한 경우에는 실험실간 밸리데이션을 통하여 그 성능이 다음 범위에 있다는 것을 보여주어야 한다.

정량법의 실험실간 밸리데이션

실험실 수 8 이상, 시료 수 5 이상으로 한다.

시료에 함유된 특정 원재료 단백질 농도 수준의 하나는 미량으로 정의되는 $10\mu\text{g/g}$ 를 포함한다. 시료는 원재료에 특정 원재료를 첨가하여 가열 등의 제조방법으로 만든 모델 가공식품을 포함해야 한다.

효소면역측정법과 같은 면역화학반응을 토대로 하는 정량법에서는 사용하는 항체에 따라 정량값, 즉 정확도가 달라질 수 있으나 알레르기 환자의 건강유지라는 관점에서 50% 이상, 150% 이하의 회수율이 필요하다. 또한 재현성은 25% 이하여야 한다.

정성법의 실험실간 밸리데이션

실험실 수 6 이상, 시료 수 5 이상으로 한다.

시료에 함유된 특정 원재료 단백질 농도 수준에는 대조군과 미량으로 정의되는 $10\mu\text{g/g}$ 을 포함한다. 시료는 원재료에 특정 원재료를 첨가하여 가열 등의 제조방법으로 만든 모델가공식품을 포함해야 한다.

동일한 시료·농도의 샘플을 각 실험실마다 2샘플 이상씩 송부하여 판정율을 평가한다. 특정 원재료 단백질을 포함하는 시료의 양성률은 90% 이상, 대조군의 음성률은 90% 이상으로 하며, 모두 95% 이상인 것이 바람직하다.

검사법은 많은 종류의 가공식품에 적용되므로 밸리데이션으로 평가하는 시료는 동물성 식품, 식물성 식품, 가공도가 높은 것(장시간 가열, 고압조리), 산성을 나타내는 것 등의 특성을 가진 식품 중에서 선택하는 것이 좋다.

실험실간 밸리데이션에 앞서 개발자 실험실에서 단일실험실 밸리데이션을 실시해야 한다. 여기서 대표적인 모델가공시료에 대해서 첨가농도 $10\mu\text{g/g}$ 에서의 정확도, 실내 정밀도를 확인하고 각종 식품의 추출액에 항원을 첨가한 시료를 사용해서 광범위한 매트릭스의 영향 및 다양한 항원의 위양성, 위음성 데이터를 수집하고 그 정보를 공개해야 한다. PCR법 및 웨스턴블롯법과 같은 정성검사법은 적어도 20종류 이상의 성질 및 가공 정도가 다른 매트릭스 속에서의 오판정율을 확인해야 한다. 낮은 농도에서는 당연히 오판정율이 높아진다. 오판정율이 50% 이상이 되면 추정되는 농도를 판정한계로 제시하는 것이 바람직하다.

검량선용 표준액 조제, 정확도 확인을 위해서는 별첨 3에 제시된 표준품 규격에 적합한 표준품을 사용하는 것이 좋다. 그와 같은 표준품을 사용할 수 없는 경우에는 사용하고 있는 표준액, 표준품과의 농도관계를 밝히고 검출법간의 결과를 해석할 수 있는 정보를 제공해야 한다.

5. 특정 원재료 검사자의 신뢰성 확보시스템에 관한 제언

효소면역측정법, 웨스턴블롯법, 중합효소연쇄반응법(PCR법) 등의 특정 원재료 검사를 실시하는 시설은 3개의 실험실의 신뢰성을 보증하고자 제시한, 도입 시 밸리데이션, 내부정밀도관리, 기법관리를 실시하여 검사 결과의 신뢰성을 보증해야 한다.

참고 1 정량검사법의 실험실간 밸리데이션의 예

(가상데이터를 사용하여 분석법 밸리데이션 결과를 공표하는 서식을 제시하였음. 키트 등에 첨부할 자료 작성에 참고하기 바람)

밸리데이션 대상

알(卵) 검출용 X 키트

시료

소시지, 소고기 레토르트 파우치, 비스킷, 오렌지주스, 잼. 각 시료에는 알 1차 표준분말을 단백 농도가 10 μ g/g이 되도록 첨가하였다.

참가기관

10개 기관

- | | |
|-------------|------------|
| · A사 ○○연구소 | · B연구소 |
| · C협회 XX연구소 | · D사 △△연구소 |
| · E연구소 | · F사 ○X센터 |
| · G사 ○○부 | · H연구센터 |
| · I 분석센터 | · J사 ○○연구소 |

절차

추출방법·키트 조작방법·보고양식에 관한 문서, 시료(5종류), 키트를 각 참가기관에 송부하였다. 참가기관은 각 시료 당 2회의 추출·측정을 실시하였다. 각 추출액의 측정은 3개의 웰을 사용하였으며, 동일 플레이트 상에서 8가지 농도(대조군을 포함한다)의 검량선을 측정하여 얻은 결과를 코디네이터에게 반송하였다.

코디네이터는 참가기관이 보내 온 데이터를 벗어난 값을 제외시키기 위해 AOAC INTERNATIONAL 또는 JIS Z 8402-2의 절차에 따라 Cochran 검정과 Grubbs 검정(둘 다 유의 수준 2.5%)을 실시한 후에 평균값, 병행재현성 및 실험실간 재현성을 구하였다.

밸리데이션의 결과

표 A-1은 각 키트의 밸리데이션으로부터 얻은 회수율, 반복성(RSD_r) 및 재현성(RSD_R)을 나타낸 것이다. 회수율 및 재현성(RSD_R)은 모두 별첨 알레르겐을 함유하는 식품의 검사방법에 제시된 기준을 충족하고 있다.

표 A-1 알 검출용 X 키트 밸리데이션의 결과

시료	계산에 포함된 기관 수	회수율	반복성(RSD%)	재현성(RSD%)
소시지	10	67.2	4.1	14.5
소고기 레토르트	10	76.3	2.2	9.6
비스킷	9	66.1	4.7	10.8
오렌지주스	10	97.7	2.4	6.6
잼	10	95.3	2.7	5.9

참고 2 정성검사법에 관한 실험실간 밸리데이션의 예
(가상데이터를 사용하여 분석법 밸리데이션의 결과를 공표하는 서식을 제시하였음. 키트 등에 첨부할 자료 작성에 참고하기 바람.)

밸리데이션의 대상
PCR법에 의한 땅콩 검사방법

시료
비스킷, 초콜릿, 카레 페이스트, 시리얼, 미트 페이스트. 탈지한 땅콩분말을 단백질도가 0, 2, 10μg/g이 되도록 첨가하였다.

참가기관
6개 기관

· A사 ○○연구소
· C협회 X X 연구소
· E연구소

· B연구소
· D사 △△연구소
· F사○ X 센터

절차
시료 30개(5시료×3농도×2, 무작위로 코드 부여), 프라이머 2종류, 실험 프로토콜을 각각 참가기관에 송부하였다. 참가기관은 2주 이내에 각 시료의 측정 결과를 송부하였다.

밸리데이션의 결과는 표 A-2와 같다. 모든 시료에서 식물 DNA 검출 프라이머를 사용한 결과는 양성을 나타냈다. 땅콩 농도가 0μg/g인 대조군은 모두 가공시료에서 땅콩 특이적 프라이머에 의한 결과가 음성이었으며, 10μg/g의 땅콩을 함유하는 시료는 모두 결과가 양성이었다. 이상으로부터 대조군의 음성율, 2mg/kg 및 10mg/kg 첨가시료에서의 양성율은 90% 이상이었으며, 별첨 알레르겐을 함유하는 식품의 검사방법에 관한 기준을 충족하였다.

표 A-2

땅콩 농도 (mg/kg)	시료	식물 DNA 검출 프라이머 양성율	땅콩 특이적 프라이머 양성율
0	비스킷	12/12	0/12
	초콜릿	12/12	0/12
	카레 페이스트	12/12	0/12
	시리얼	12/12	0/12
	미트 페이스트	12/12	0/12
2	비스킷	12/12	12/12
	초콜릿	12/12	12/12

10	카레 페이스트	12/12	11/12
	시리얼	12/12	12/12
	미트 페이스트	12/12	12/12
	비스킷	12/12	12/12
	초콜릿	12/12	12/12
	카레 페이스트	12/12	11/12
	시리얼	12/12	12/12
	미트 페이스트	12/12	12/12

참고 3 정량검사용 효소면역측정법(ELISA) 키트의 정밀도

3.3. 기법 관리 정밀도의 구조에서 기술한 것과 같이 알레르기 유발물질 검출에 사용된 샌드위치 효소면역측정법에서는 방해가 없는 상황에서 달성할 수 있는 반복성(웰간의 편차)은 마이크로피펫에 의한 액체 주입의 오차, 플레이트 웰간의 흡광도의 편차 등으로부터 구한다. 여기서는 실제로 표준액을 6개의 웰에 나누어 주입해서 얻은 흡광도에 관한 반복성과 계산식으로 구한 정밀도(정밀도 프로파일)를 제시한다.

사용 키트

- A 모리나가생과학연구소 FASPEK 특정 원재료 측정 키트(난알부민)
- B. 닛폰햄 FASTKIT ELISA Ver. II 시리즈(밀)

정밀도 프로파일 계산

다음 식에 따라 각 농도의 정밀도를 계산하였다.

$$\rho_T^2 = \rho_X^2 + \rho_S^2 + \left(\frac{\sigma_W}{f(X)} \right)^2$$

ρ_T : 측정값의 RSD

ρ_X : 분석대상물질 주입량의 RSD(피펫의 편차)

ρ_S : 반응기질용액량의 편차가 흡광도 측정값의 편차에 미치는 영향

$\rho_S = (\text{피펫에 의한 주입량의 RSD}) \cdot (2/3)$.

σ_W : 웰 자체의 흡광도 SD(웰간 흡광도의 SD)

$f(X)$: 흡광도를 나타내는 검량선(X는 분석대상물질의 농도)

$\rho_X = 0.6\%$, $\sigma_W = 0.004$ 로 얻은 정밀도 프로파일 및 실측 정밀도를 그림 A-1에 나타내었다.

동일 용액으로부터 얻은 흡광도의 편차는 흡광도가 작은 저농도 범위를 제외하면 대략 RSD%로 5% 이하이다.

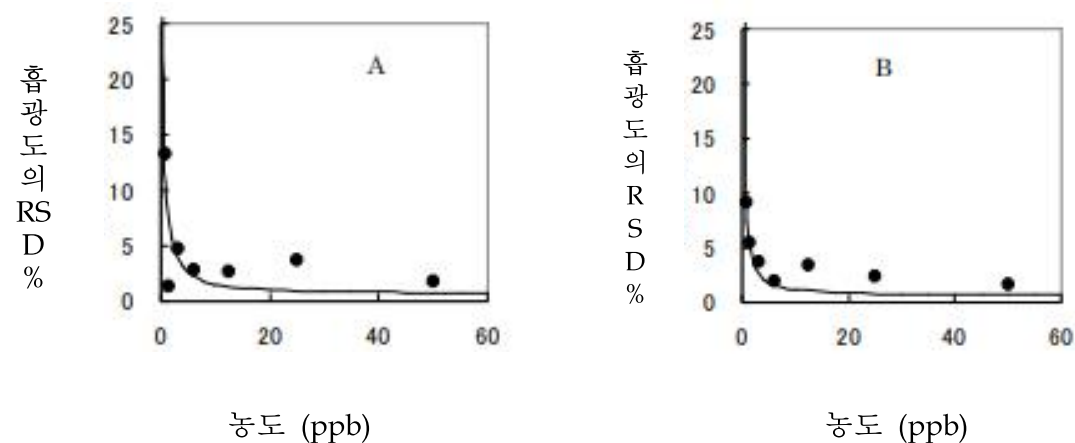


그림 A-1 특정 원재료 검출 키트의 정밀도 프로파일

A. 모리나가생과학연구소 FASPEK 특정 원재료 측정 키트(난백알부민)

B. 닛폰햄 FASTKIT ELISA Ver. II 시리즈(밀)

● 각 농도 표준액의 반복성(n=6) 실선 식 A1으로부터 구한 정밀도

(별첨 5)

알레르겐을 함유하는 식품의 검사방법 개량법 평가에 관한 가이드라인

실험실간 밸리데이션을 통해 그 성능이 평가되고 별첨 알레르겐을 함유하는 식품의 검사방법에서 제시하는 기준을 충족하는 것이 제시된 정량검사법 또는 그와 동등 이상의 성능을 가진다고 이미 인정받은 방법(이하 '기존법'이라 한다)을 개량한 정량검사법(이하 '개량검사법'이라 한다)에 대해서는 단일 실험실에서의 검토를 통하여 다음과 같은 성능을 평가하고, 기존법과 동등 이상의 성능을 나타낸 경우에는 기존법과 동일하게 알레르기 유발물질을 함유하는 식품의 검사방법으로 간주한다.

1. 검량선

개량검사법의 검량선 농도범위 및 정량성이 기존법과 동등하다는 것을 나타낸다.

2. 기존법과의 상관관계

복수의 시료를 기존법과 개량검사법으로 정량하여 개량검사법이 기존법과 동등하다는 것을 나타낸다.

구체적으로는 X축에 기존법에 의한 정량값, Y축에 개량검사법에 의한 정량값을 대입하여 그 상관관계를 플롯한다. 이 플롯에 대해 Y절편을 0으로 하는 근사직선($Y=aX$)을 산출하고 그 기울기가 0.75-1.25의 범위에 있다는 것과 상관계수가 0.9 이상이라는 것을 나타낸다.

검사방법 1종류에 대해 정량값이 수 $\mu\text{g/g}$ 부터 10,000 $\mu\text{g/g}$ 까지의 범위에 편중되지 않고 분포하는 시료(단, 대상 농도 범위의 시료 확보가 어려운 경우에는 10,000 $\mu\text{g/g}$ 를 넘는 시료를 포함해도 된다)에 대해서 10종 이상을 검토하여 기존법과 개량검사법의 상관관계를 플롯한다.

이와 함께 특히 수 $\mu\text{g/g}$ 부터 수 10 $\mu\text{g/g}$ 까지의 범위에 대해서는 편중되지 않고 분포하는 10종 이상의 시료의 정량값을 다시 별도로 플롯하고(단, 대상 농도 범위의 시료를 확보하기 어려운 경우에는 고농도시료를 희석하여 측정했을 때의 측정값을 사용해도 된다), 상기 기준을 충족하는 상관관계가 나타나는지 확인한다.

시료로는

- 시판 가공식품
- 식품재료에 특정 원재료 단백질을 첨가하여 조제한 모델가공식품
- 특정 원재료를 함유하는 가공식품과 특정 원재료를 함유하지 않는 동일한 가공식품을 혼합하여 특정 원재료 단백질 농도를 조제한 것
- 특정 원재료를 함유하지 않는 가공식품에 특정 원재료 단백질을 첨가한 것 등을 사용한다. 또한 동물성 식품, 식물성 식품, 가공도가 높은 것, 산성을 나타내는 식품 등 각종 특성을 지닌 식품을 시료로 사용하는 것이 바람직하다.

상기 근사값 선의 기울기가 0.8 이하 또는 1.2 이상인 경우에는 상기의 검토와 함께 3종류 이상의 시료(단, 시료에 포함된 특정 원재료 단백질 농도 수준으로는 10µg/g 정도를 포함한다)를 사용하여 회수율을 검토해서 50% 이상 150% 이하의 회수율이 나오는 것이 바람직하다.

시료로는 위와 동일한 가공식품 중 특정 원재료 단백질을 이미 알고 있는 것을 사용한다.

3. 정밀도

1-20µg/g 정도의 특정 원재료 단백질을 함유하는 시료(시료 수 2-3 정도)를 사용하여 반복성(시행 횟수는 5회 이상) 및 일차변동(day-to-day variation)(3-5일간 정도)을 검토한다.

F 검정을 실시하여 기존법과 개량검사법 사이에서 반복성 및 일차변동이 동등하며, 동등하지 않은 경우에는 개량검사법의 정밀도가 높게 나타난다.

그 밖에도 일내 변동(daily variation), 분석자간 변동, 기기간 변동 등에 대해서도 검토하는 것이 바람직하다.

4. 검출한계, 정량한계

검출한계, 정량한계 값이 기존법과 동등하거나 작은 값으로 나타난다.

5. 특이성

위양성, 위음성을 나타내는 식품에 대해서 검토하여 기존법과의 일치점 및 상이점을 명확히 나타낸다.