

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0065358

(43) 공개일자 2022년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/10 (2006.01) G01N 24/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/10 (2013.01)

G01N 24/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0151766

(22) 출원일자 2020년11월13일

심사청구일자 2020년11월13일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

중앙대학교 산학협력단

서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)

(72) 발명자

김영석

경기도 고양시 일산동구 강송로 196, 113동 1301호 (강촌마을1단지아파트)

김소연

경기도 용인시 수지구 수풍로 90, 107동 1402호 (수지4차삼성래미안)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

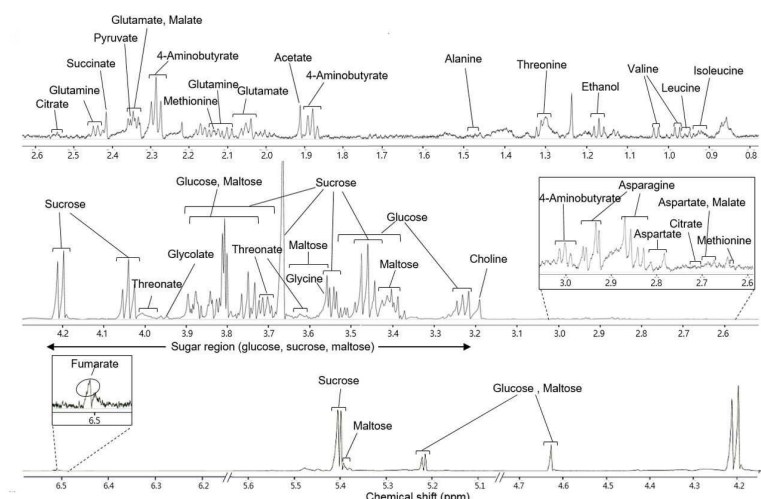
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법

(57) 요약

본 발명은 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법에 관한 것이다. 본 발명의 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커를 이용하면, DNA 분석이나 표준물질 없이, 백미 또는 현미 내 대사체의 수준변화를 이용하여 국내산 백미 또는 현미인지, 수입산 백미 또는 현미인지의 여부를 정확하게 판별할 수 있다. 본 발명의 바이오마커는, 실제 단속에 이용하여 원산지를 속여 부당한 이익을 취하는 행위를 단속할 수 있는 중요한 도구로써 사용할 수 있으며, 이는 국내 유통 농산물의 시장질서 확립과 소비자들의 신뢰 확보에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

김석영

서울특별시 동작구 상도로41다길 11-4, 403호

이도엽

서울특별시 관악구 관악로 1, 122동 403호 (서울대학교 교수아파트)

이보미

서울특별시 강서구 남부순환로11길 11-5, 302호

이은미

경기도 부천시 평천로 616, 2112동 1302호 (다정한마을삼성래미안아파트)

최형균

서울특별시 마포구 서강로9길 45, 108동 402호 (태영아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545018529
과제번호	316081044SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	첨단생산기술개발(R&D)
연구과제명	농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문 활용 플랫폼 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2016.09.05 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

한국산 또는 수입산인 백미 또는 현미의 원산지에 따라 발현량에서 차이를 나타내는, 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate), 글리콜레이트(glycolate), 콜린(choline), 말토스(maltose) 및 아세테이트(acetate)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 대사체를 포함하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 수입산은 중국산인 것을 특징으로 하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate) 및 글리콜레이트(glycolate)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 대사체의 발현량은 수입산 백미와 비교하여 한국산 백미에서 증가하는 것을 특징으로 하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 콜린(choline), 글루코스(glucose), 말토스(maltose), 수크로즈(sucrose) 및 아세테이트(acetate)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 대사체의 발현량은 수입산 현미와 비교하여 한국산 현미에서 증가하는 것을 특징으로 하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 백미 또는 현미 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 포함하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 키트.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 백미 또는 현미의 원산지 판별 방법:

(a) 백미 또는 현미 시료에서 추출된 대사체와 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 접촉에 따른 이온 세기의 증가를 측정하여 원산지를 판정하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 수입산은 중국산인 것을 특징으로 하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate) 및 글리콜레이트(glycolate)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 대사체의 발현량은 수입산 백미와 비교하여 한국산 백미에서 증가하는 것을 특징으로 하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 콜린(choline), 글루코스(glucose), 말토스(maltose), 수크로즈(sucrose) 및 아세테이트(acetate)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 대사체의 발현량은 수입산 현미와 비교하여 한국산 현미에서 증가하는 것을 특징으로 하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 원산지란 그 물품이 성장했거나, 생산, 제조, 가공된 지역을 말하며, 수출입 물품의 경우 국적을 의미한다. 전 세계적인 자유무역협정(FTA)의 확대로 농산물들이 자유롭게 각국의 국경을 넘나들 수 있는 가능성이 커졌으나, 국가들 간의 교역을 통한 농산물의 원산지가 위조되어 판매되는 경우가 발생하여 시장 질서를 교란시키고 소비자들의 불신을 사고 있다. 우리나라 원산지 표시 제도는 1991년 7월 1일부터 시행되고 있으며, 대외무역법령에 '원산지 판정 기준', '원산지 표시 대상 물품', '위반시의 벌칙' 등에 관한 규정을 두고 있다.

[0003] 관세법령에는 통관 시의 원산지 및 그 표시의 확인 및 시중 유통 과정에서의 단속 등에 관한 규정을 두어 운영하고 있다. 국립농산물품질관리원은 2014년 4290개 업체가 농식품의 원산지를 속여 판매하다가 적발되었다고 밝힌 바 있으며, 2012년에는 4642개, 2013년에는 4443개 업체가 원산지를 위조하다 적발되었다. 해마다 적발되는 업체의 수가 소폭 감소하고 있지만, 여전히 하루에 10개 이상의 업체가 적발되고 있다. 정부에서는 "불량식품"을 4대 사회악 중 하나로 포함시켜서 이의 근절을 위해 다각적으로 심혈을 기울이고 있으나, 식품으로 직접 사용되거나 가공식품의 주요 원료가 되는 농산물의 원산지 변조를 막지 못하고 있다. 국내 농산물 및 식품의 위변조 규모는 정확하게 알려져 있지 않지만, 전 세계적인 추세를 감안하면, 국내 전체 시장 규모의 10% 정도 차지하는 것으로 예측된다.

[0004] 또한, 이 중 약 5%, 즉 국내에서 유통되고 있는 전체 농산물 및 식품 중 약 0.5% 정도가 원산지가 위변조 되어 유통되고 있을 것으로 추정된다. 이에 농산물의 원산지를 과학적으로 판별하는 것은 국가적으로 중요한 사회문제 대두되고 있다.

- [0005] 특히, 쌀의 경우, 최근 쌀 관세화 유예 종료와 FTA 체결 등 농수산물 시장개방에 따라 농산물의 원산지 관리를 통한 국내 농산물에 대한 보호 및 육성에 대한 관심이 높아지고 있으며, 고품질 기능성 벼(쌀)의 개발과 지속적인 저관세 의무 수입 쌀(TRQ)의 수입으로 국내산 벼(쌀) 품종 간, 국내산과 외국산 벼(쌀) 품종 간 높은 가격차이가 발생되어 원산지 부정유통 사례가 끊이지 않아 과학적이고 객관적인 원산지 판별법의 개발 및 확보가 시급한 실정이다.
- [0006] 현재까지 농산물의 원산지 판별은 주로 isotope-ratio mass spectrometry(IRMS), HPLC, visible micro-Raman spectroscopy, ultraviolet-visible absorption spectroscopy(UV-vis), elemental analysis-like inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry(ICP-AES) 등을 활용한 화학적 분석으로 이루어져 왔다. 그러나 이들 연구 방법들은 모두 특정 성분이나 그룹에 초점을 맞추어 온 targeted 접근 방법으로써 한계점이 있다.
- [0007] 한편, 대사체학(metabolomics)은 세포내의 대사물질과 대사회로를 총체적으로 분석 연구하는 생물학의 분야 가운데 하나로, 농산물에 존재하는 대사체(metabolites) 들을 분석, 연구하는 학문으로 정의한다. 대사체학은 시료를 성분별로 분리하지 않고 시료 중에 존재하는 모든 대사체(metabolite)를 추출하여 분석한다. 따라서, 전처리 시간이 매우 짧아 크로마토그램에 비해 신속분석 및 전수분석이라는 장점이 있다.
- [0008] 또한, 대사체학은 농산물 내 전대사체(metabolome)를 비표적적인(non-targeted) 방식으로 분석하는 접근 방법이며, 유전적 차이나 환경적 변화에 대한 차이를 효율적으로 규명할 수 있어서 대사체학을 활용한 농산물 및 약용작물의 원산지 판별에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.
- [0009] 2010년도 이후 농산물품질관리원에서 주로 유전체 정보를 활용한 단일염기다형성마커를 이용하여 원산지 판별을 위한 키트를 개발하여 특허를 출원 중에 있거나 등록하였으나, 대사체를 이용해 국내에서 재배되는 백미 또는 현미로 구분한 쌀의 원산지를 판별하는 연구는 아직 이루어지지 않은 상태이다.
- [0010] 더욱이, 종래기술의 경우 서로 다른 벼(쌀) 품종에서 동일한 식별 마커의 증폭으로 품종을 명확히 구별하지 못하거나, 국내산 벼(쌀) 품종과 외국산 벼(쌀) 품종 간 동일한 식별 마커의 증폭으로 품종 및 원산지를 구별하는 명확한 판별 방법을 제시하고 있지는 못하는 상황이다.
- [0011] 따라서, 국내산과 수입산 백미 또는 현미를 정확히 구별하여 국내 생산 농가의 소득 보전과 부정유통 방지를 위한 판별법을 개발할 필요성이 있다.

[0012]

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위해 대사체를 이용해 국내에서 재배되는 쌀, 특히, 백미와 현미의 원산지를 판별하는 방법을 개발하는 데 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 한국산 및 수입산 쌀(백미 또는 현미)의 원산지에 따라 발현량에서 차이를 나타내는 대사체를 분석하여, 총 11 종의 백미 원산지 판별용 마커로서, 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate) 및 글리콜레이트(glycolate); 그리고, 총 5 종의 현미 원산지 판별용 마커로서, 콜린(choline), 글루코스(glucose), 말토스(maltose), 수크로즈(sucrose) 및 아세테이트(acetate); 를 확립하고, 이를 이용하여 한국산 및 수입산 백미 또는 현미의 원산지를 신속 정확하게 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 따라서, 본 발명의 일 목적은, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는 백미 또는 현미의 원산지 판별용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0016] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커를 이용하여 백미 또는 현미의 원산지를 판별하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본 발명은 다양한 변형을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고

본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

- [0019] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예들을 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0020] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0021] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 한국산 또는 수입산인 백미 또는 현미의 원산지에 따라 발현량에서 차이를 나타내는, 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate), 글리콜레이트(glycolate), 콜린(choline), 말토스(maltose) 및 아세테이트(acetate)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 대사체를 포함하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커는, 쌀을 백미 또는 현미로 구분하여, 원산지별 백미 또는 현미의 대사체의 발현 빈도 차이를 이용함으로써, 백미 또는 현미의 원산지를 정확하게 판별할 수 있는 것을 특징으로 한다. 상기 대사체의 발현 빈도는, 구체적으로, 한국산에서 상대적으로 많이 발현되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0025] 본 명세서에서 사용된 용어 "원산지"는, 그 물품이 성장했거나, 생산, 제조 가공된 지역을 말하여 수출입 물품의 경우 국적을 의미한다. 우리나라의 원산지 표시제도는 1991년 7월 1일 부터 시행되고 있으며, 대외무역법령에 「원산지 판정 기준」, 「원산지 표시 대상 물품」, 「위반시의 벌칙」 등 에 관한 규정을 두고 있다. 관세법령에는 통관 시의 원산지 및 그 표시의 확인 및 시중 유통 과정에서의 단속 등에 관한 규정을 두어 운영하고 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용된 용어 "백미" 또는 "현미"는 벼 수확 직후의 다양한 수분함량을 지니는 산물벼를 도정하여 가공한 상태의 쌀을 의미한다.
- [0027] 또한, 상기 백미는 쌀겨와 배아를 모두 제거한 쌀이며, 현미는 벼의 외강층만이 제거되어 배아의 일부와 배유부가 남아있는 쌀을 의미하며, 도정도에 따라 강층의 가장 내측에 위치하는 호분층의 잔류정도에 차이가 있긴하나, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 이에 한정되지 않고, 통상적으로 당업계에서 지칭하는 백미 또는 현미라면 본 발명의 대상이 될 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된 용어 "판별"은, 백미 또는 현미의 원산지가 어느 곳인지 결정하여 구별하는 것을 의미한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용된 용어 "백미 또는 현미 원산지 판별용 바이오마커"는 원산지로부터의 백미 또는 현미 내에 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate), 글리콜레이트(glycolate), 콜린(choline), 말토스(maltose) 및 아세테이트(acetate)로 이루어진 군으로부터 1 종 이상의 대사체들이 발현되어 상기 대사체들의 발현 빈도(수준)을 이용함으로써 원산지를 판별할 수 있는 바이오마커를 의미한다.
- [0030] 상기 백미 또는 현미 원산지 판별용 바이오마커로 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate), 글리콜레이트(glycolate), 콜린(choline), 말토스(maltose) 및 아세테이트(acetate)를 단독 또는 1 종 이상을 조합하여 사용할 수 있다.

- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 백미 또는 현미 원산지 판별용 바이오마커 조성물은, 보다 구체적으로 백미 원산지 판별용 바이오마커로서, 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate) 및 글리콜레이트(glycolate)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 11 종을 모두 포함할 수 있다.
- [0032] 즉, 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate) 및 글리콜레이트(glycolate)의 발현량은 중국산 백미와 비교하여 한국산 백미에서 증가하는 총 11 종의 바이오마커를 모두 포함하는 백미 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 사용할 경우, 국내 또는 해외 지역, 바람직하게는 중국 지역에서 생산되는 백미의 원산지를 보다 정확하게 판별할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 백미 또는 현미 원산지 판별용 바이오마커 조성물은, 보다 구체적으로 현미 원산지 판별용 바이오마커로서, 콜린(choline), 글루코스(glucose), 말토스(maltose), 수크로즈(sucrose) 및 아세테이트(acetate)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 5 종을 모두 포함할 수 있다.
- [0034] 즉, 콜린(choline), 글루코스(glucose), 말토스(maltose), 수크로즈(sucrose) 및 아세테이트(acetate)의 발현량은 중국산 현미와 비교하여 한국산 현미에서 증가하는 총 5 종의 바이오마커를 모두 포함하는 백미 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 사용할 경우, 국내 또는 해외 지역, 바람직하게는 중국 지역에서 생산되는 현미의 원산지를 보다 정확하게 판별할 수 있다.
- [0035] 이에 따라, 백미 또는 현미의 원산지를 명확하게 확인할 수 있게 되어, 백미 또는 현미의 원산지에 대한 신뢰성을 확보할 수 있어, 소비자는 믿고 국산 백미 또는 현미를 구입할 수 있으며, 생산자는 신뢰성 확보를 통해 백미 또는 현미 판매 시장을 더 활성화시킬 수 있게 된다.
- [0036] 즉, 본 발명은 국내 및 외국에서 수집된 백미 또는 현미 품종을 대상으로 분자 마커로서 대사체를 이용한 백미 또는 현미 원산지 판별 방법 및 체계를 확립하였다.
- [0037] 본 발명에 따르면, 국내산 및 수입산 백미 또는 현미를 식별할 수 있으므로, 농산물 원산지표시제에도 활용할 수 있다. 나아가, 백미 또는 현미 품종의 진위성 규명, 종자분쟁의 중재 및 품종보호 출원품종의 대조품종 선정 등과 같은 분야에 기여할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 포함하는, 백미 또는 현미의 원산지 판별용 키트를 제공한다.
- [0040] 본 발명의 백미 또는 현미의 원산지 판별용 키트는 원산지가 의심되는 백미 또는 현미시료로부터 상기 대사체를 검출하거나 정량분석하여 백미 또는 현미시료의 원산지를 판별하는데 사용될 수 있으며, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0041] 또한, 상기 백미 또는 현미의 원산지 판별용 키트는 대사체를 검출하기 위한 직접적인 수단뿐만 아니라 분석 방법에 사용되는 다른 구성 성분, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 그 예로써 테스트 튜브, 컨테이너, 반응 완충액, 분석용 효소, 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 백미 또는 현미의 원산지 판별용 키트는 상술한 바이오마커를 포함하여 시료의 대사체를 정량 분석함으로써 백미 또는 현미의 원산지를 판별할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0043] 본 발명의 키트는 시료를 담지할 수 있는 통상의 웰 형태의 마이크로타이터 플레이트를 포함할 수 있다. 상기 웰 내에는 시료 및 하나 이상의 바이오마커를 흡수할 수 있는 다공성 지지체를 포함할 수 있다. 상기 지지체는 백미 또는 현미 대사체 추출물의 첨가를 대비하여 내부 바이오마커를 미리 결정된 농도로 포함하고 있으며, 아울러 각 시료를 고정할 수 있다. 또한, 지지체의 다공성은 시료 분석 시 첨가되는 추출 용매에 최대한 노출되게 할 수 있다.
- [0044] 따라서, 상기 지지체는 높은 수준의 다공도를 가진 임의의 지지체일 수 있으며, 이러한 지지체는 종래 기술분야에서 공지되어 있으며, 또는 상업적으로 구입 가능하다.
- [0045] 구체적으로, 고품 지지체일 수 있다. 보다 구체적으로는 액체에 대한 흡수성 물질로 이루어져 있다. 상기 흡수성 물질은 흡착제 또는 흡착성 물질일 수 있다.

- [0046] 상기 액체 흡수성 물질은 바이오마커의 용액과 분석용 후속 시료가 기공을 통해 일정하게 흡착 또는 흡수되게 한다.
- [0047] 상기 흡수성 물질로 셀룰로오스와 같은 카보하이드레이트 물질, 유리 섬유, 유리 비드, 폴리아크릴아미드 젤, 다공성 플라스틱 불활성 폴리머 및 다공성 흑연 중에서 하나 이상을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로는, 아가로오스, 아가, 셀룰로오스, 텍스트란, 키토산 또는 곤약과 같은 카보하이드레이트 물질이나 그 유도체, 카나기난, 젤란 또는 알기네이트를 포함할 수 있다. 가장 구체적으로는, 셀룰로오스 또는 유리 섬유일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 키트에 포함된 바이오마커는 시료에 존재하는 대사체의 양을 정량하기 위해 유사 또는 동일한 유사체에 대한 비교로 사용되는, 양을 알고 있는 절대량의 비교물질인 것으로 이해할 수 있다. 상기 바이오마커는 시료의 대사체와의 적절한 구별을 위해 동위원소로 표지될 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명의 키트에 사용할 수 있는 시료는 백미 또는 현미 원산지별 대사체 추출물로서, 액체 시료의 형태로 키트에 제공될 수 있다.
- [0050] 상기 대사체를 추출하는 방법은 대사체 분석 분야에 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 것이라면 제한 없이 선택하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 여과법, 냉침추출, 열수추출, 침지추출, 가열추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등으로 대사체를 추출할 수 있으며, 1회 내지 10회 반복 추출할 수 있다.
- [0051] 상기 대사체의 추출방법은 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 용매추출법을 이용한다. 상기 용매는 백미 또는 현미의 대사체를 용해할 수 있는 것이라면 특별히 제한하지는 않는다. 예를 들어, 상기 용매로, 물; 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급 알코올; 아세톤; 트리플루오로에탄올; 테트라하이드로퓨란; 디클로로메탄; 포스페이트; 및 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다.
- [0052] 예컨대, 상기 대사체 추출물은 메탄올 및 물의 혼합용매, 구체적으로 1:1 내지 9:1의 부피비, 보다 구체적으로는 7:3의 부피비로 혼합한 혼합용매에서 백미 또는 현미를 균질화하여 얻을 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0053] 또한, 대사체의 추출 범위를 보다 넓게 하기 위해 상기 용매 내에서 백미 또는 현미 시료를 균질화하는 과정을 추가적으로 실시할 수 있다.
- [0054] 또한, 상기 마이크로타이터 플레이트는 분석물을 배출하기 위한 필터 및 배출구 등을 추가로 포함할 수 있으며, 이들의 배치, 배출방법 등은 당업자 수준에서 이해될 수 있는 범위 내에서 조정 가능하다.
- [0055] 또한, 본 발명의 키트는 통상적으로 분석장치와 조합하여 대사체 범위를 정량 표적 분석하기 위하여 여러 가지 대사체를 준비할 수 있는 기구에 포함된 시약, 용매, 소프트웨어 시스템 등을 더 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 키트는 상술한 조성물을 이용하므로, 상술한 바와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0058] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 백미 또는 현미의 원산지 판별방법을 제공한다:
- [0059] (a) 백미 또는 현미 시료에서 추출된 대사체와 상술한 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 접촉시키는 단계; 및
- [0060] (b) 상기 접촉에 따른 이온 세기의 증가를 측정하여 원산지를 판정하는 단계.
- [0061] 상기 (a) 단계의 접촉은 동위원소 등으로 표지된 본 발명의 바이오마커를 포함하는 마이크로타이터 플레이트 내에서 이루어질 수 있다.
- [0062] 상기 (b) 단계는 상기 접촉에 따른 이온 세기의 증가를 측정하여 원산지를 판정하는 단계이다.
- [0063] 표적 대사체의 농도를 계산하기 위하여 적절한 바이오마커와 함께 수득되는 이온 세기를 사용한다. 바이오마커는 특징적인 하나의 이온 쌍(또는 수개의 이온 쌍)을 이용하여 식별되며, 수득되는 이온 세기는 바이오마커의 알고 있는 농도와 관련 있어 상응하는 표적 대사체의 정량화가 가능하다. 표적 대사체는 사전에 공지되어 있으며, 미리-주석을 달아둘 수 있다. 따라서, 검출 및 정량된 대사체에는 이미 주석이 달려, 빠르고 직접적인 해석이 가능하다.
- [0064] 표적 대사체의 질량 측정은 이온 종들을 구별하기 위해 MSMS 분석이 가능한 질량 측정기를 사용할 수 있으나,

이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [0065] 상기 결과로부터 대사체의 정량분석에 의한 이온 세기의 증가를 비교하여 백미 또는 현미의 원산지를 판별할 수 있는 것이다.
- [0066] 바람직하게는, 상기 수입산은 중국산이다.
- [0067] 바람직하게는, 상기 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 메티오닌(methionine), 알라닌(alanine), 수크로즈(sucrose), 푸마레이트(fumarate), 글루타민(glutamine), 아스파르테이트(aspartate), 글루코스(glucose), 글루타메이트(glutamate) 및 글리콜레이트(glycolate)의 발현량은 수입 중국산 백미와 비교하여 한국산에서 증가한다.
- [0068] 또한, 바람직하게는, 콜린(choline), 글루코스(glucose), 말토스(maltose), 수크로즈(sucrose) 및 아세테이트(acetate)의 발현량은 수입 중국산 현미와 비교하여 한국산에서 증가한다.
- [0069] 본 발명의 일 구현예에서, 국내산 및 수입 중국산 백미 또는 현미 시료에서 차이를 보이는 선별된 대사체에 대해 NMR 분광법으로 분석한 결과를 다변량 분석법으로 분석하여 데이터를 얻고, 이를 기반으로 하여 서로 다른 원산지의 백미 또는 현미 시료 간의 대사체의 차별성을 판별한다.
- [0070] 상기 다변량 분석법은 본 발명에서 그 방법을 특별히 한정하지 않는다. 예를 들어, 주성분분석(Principal Component Analysis; PCA), 최소자승 분석(Partial Least Analysis; PLS)과 판별분석(Discriminant Analysis; DA)(PLS-DA), 직교 최소자승 분석(Orthogonal Partial Least Analysis; OPLS)과 판별분석(OPLS-DA) 등이 가능하다. 바람직하기로는 직교 최소자승 분석과 판별분석(OPLS-DA)을 이용한다.
- [0071] 구체적으로, SIMCA 프로그램을 이용하여 직교 최소자승 분석 및 판별분석(OPLS-DA)을 수행하여 OPLS-DA 스코어 플롯을 사용한다.
- [0072] 또한, 원산지 판별 모델의 교차 검증을 위해 leave-one-out cross validation을 수행함으로써 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) 및 정확도(accuracy)를 산출가능하게 하여 설립된 판별 모델의 유효성을 검증하였다.
- [0073] 본 발명에서 국내산 또는 수입산 백미 또는 현미 시료에서 발현 수준이 차이나는 대사체를 백미 또는 현미의 원산지를 판별할 수 있는 바이오 마커로 선정하였고, 이를 이용하는 경우 보다 일관성 있고 신뢰도 높은 정확한 원산지 판별을 가능하므로, 실제 원산지 단속에 적용할 수 있다.

발명의 효과

- [0075] 본 발명의 백미 또는 현미의 원산지 판별용 바이오마커를 이용하면, DNA 분석이나 표준물질 없이, 백미 또는 현미 내 대사체의 수준변화를 이용하여 국내산 백미 또는 현미인지 수입산 백미 또는 현미인지의 여부를 정확하게 판별할 수 있다. 본 발명의 바이오마커는, 실제 단속에 이용하여 원산지를 속여 부당한 이익을 취하는 행위를 단속할 수 있는 중요한 도구로써 사용할 수 있으며, 이는 국내 유통 농산물의 시장질서 확립과 소비자들의 신뢰 확보에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0077] 도 1a는 국내산 백미 내 대사체의 ^1H -NMR 스펙트럼을 보여준다. 도 1b는 국내산 현미 내 대사체의 ^1H -NMR 스펙트럼을 보여준다.
- 도 2는 백미(한국산 및 중국산 풀링)에 대한 2D-NMR 스펙트럼을 보여준다((A) ^1H - ^1H COSY NMR 스펙트럼; (B) ^1H - ^{13}C HSQC NMR 스펙트럼).
- 도 3은 현미(한국산 및 중국산 풀링)에 대한 2D-NMR 스펙트럼을 보여준다((A) ^1H - ^1H COSY NMR 스펙트럼; (B) ^1H - ^{13}C HSQC NMR 스펙트럼).
- 도 4는 한국산 및 중국산 백미 원산지 분리 OPLS-DA 모델 score plot (A) 및 leave-one-out cross validation plot (B)을 보여준다.
- 도 5는 한국과 중국산 현미 원산지 분리 OPLS-DA 모델 score plot (A) 및 leave-one-out cross validation

plot (B)을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1. NMR(Nuclear Magnetic Resonance)-기반 한국산과 중국산 백미 또는 현미 시료 내 대사체 분석

본 발명자들은 백미 또는 현미의 원산지(한국산 및 중국산)를 판별하고자 지역별 시료 내 대사체 차이를 NMR(Nuclear Magnetic Resonance) 기반으로 하여 분석하였다. 국내산 백미 또는 현미 시료와 중국산 백미 또는 현미 시료는 하기 표 1에 나타난 지역에서 생산된 것을 구입하여 이하 본 실시예에 이용하였다.

[표 1]

생산국가	품종	지역(도/성)	도시
한국	오대	강원도	철원, 춘천
		경기도	수원, 화성
		충청도	청주
		전라도	전주
		경상도	상주
	일품	강원도	춘천
		경기도	수원, 화성
		충청도	청주
		전라도	전주
		경상도	상주, 밀양, 예천
	삼광	경기도	파주
		경상도	경주
		충청도	아산
	대안	경기도	연천
		강원도	횡성
		강원도	양양
	황금노들	충청도	청주
	새일미	충청도	서산

		경상도	함안
		전라도	강진
	신동진	전라도	김제
			해남
	새누리	전라도	진안
	영호진미	경상도	함안
중국	정보없음	흑룡강	허강(hegang)
			하얼빈(Haerbin)
		허난	신샹(Xinxiang)
		랴오닝	후루다오(Huludao)
		길림	연변 조선족 자치주 (YanbianChaoxianzuzizhizhou)
현미			
한국	오대	강원도	철원, 춘천
		경기도	수원, 화성
		충청도	청주
		전라도	전주
		경상도	상주
	일품	강원도	춘천
		경기도	수원, 화성
		충청도	청주
		전라도	전주
		경상도	상주, 밀양
중국	정보없음	흑룡강	허강(hegang)
			쌍야산(shuangyashan)

	자무쓰(Jiamusi)
	하얼빈(Haerbin)
랴오닝	후루다오(Huludao)
	난양(Nanyang)
허난	신샹(Xinxiang)
	상구(Shangqiu)
장쑤	타이저우(taizhou)
	짜오좡(Zaozhuang)
산둥	린이(Linyi)
	태안(Taian)
산서	창지(changzhi)
호북(후베이)	황강(Huanggang)
쓰촨	난충(Nanchong)

[0086] NMR을 이용한 쌀(백미 또는 현미) 대사체 분석을 위해 전처리 방법으로, 각 시료를 액체질소에 10 초 동안 동결 후 50초 동안 분쇄하여 사용하였다. 시료 0.10g에 100% D₂O (0.1 mM TSP) 용액을 1.5 mL를 넣고 1분간 볼텍싱 하였다. 15 분간 초음파 추출 후 원심분리하여 상층액을 0.45 μ m PVDF 실린지 필터로 여과하였다. 여과액 (600 μ L)를 NMR 튜브에 옮겨 분석하였다. NMR 측정 시 시그널이 이동하는 것을 방지하기 위하여 D₂O에 인산칼륨을 첨가한 완충액 용액을 만들어주고, 1 N NaOD를 첨가하여 D₂O의 pH를 6으로 조정하였다. D₂O 용매 안에 함유된 0.05% 3- TSP [(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt]는 내부표준물질로서 NMR 케미컬 쉬프트(chemical shift)의 교정 기준(calibration reference)으로서 사용하였다.

[0088] 실시예 2. NMR 가동

[0089] 본 발명자들은 NMR spectrometer는 AVANCE 600 FT-NMR (600.13 MHz, Bruker사) 기기를 활용하였다. 시료 추출물은 298 K (25℃에서 측정하였다. 1D ¹H-NMR에서는 pulse sequence로서 물 피크를 저하시키는 zqpr presaturation pulse sequence를 이용하였으며, relaxation delay는 2초, 128 스캔수, 10,775.9 Hz의 spectral width를 적용하였다.

[0091] 실시예 3. 1D 및 2D NMR을 활용한 대사체 동정(identification)

[0092] 본 발명자들은 Chenomx software program 내에 구축되어 있는 대사체 library, HMDB web site 등을 이용하여 대사체들의 chemical shift(δ), splitting pattern, integral, 예상 농도 정보 등을 matching 시킴으로써, 한국산 백미 또는 현미 시료 내에 함유된 대사체의 정성분석을 수행하였다.

[0093] 또한, Mestrenova software program을 이용하여 대사체들의 J value를 계산하여 정성분석에 이용하였다.

[0094] 그 결과, 도 1a 및 1b에 나타낸 바와 같이, ¹H-NMR (600 MHz) 분석을 통해 하기와 같이 한국산 백미(도 1a) 및 현미(도 1b)로부터 총 24개의 대사체(4-aminobutyrate, acetate, alanine, asparagine, aspartate, choline, ethanol, fumarate, glucose, glutamate, glutamine, glycine, glycolate, isoleucine, leucine, malate, methionine, pyruvate, succinate, sucrose, threonate, threonine, valine)가 검출되었고, 상기 검출된 한국산 백미 또는 현미 내 대사체 목록은 하기 표 2에 나타내었다.

[0096] [표 2]

Compound	Chemical shift (multiplicity, J value)	Assignment method
4-Aminobutyrate	1.84-1.92 (m), 2.29 (t, J=7.4), 3.00 (t, J=7.2)	1D
Acetate	1.91 (s)	1D
Alanine	1.47(d, J=7.2)	1D
Asparagine	2.80-2.92(m), 2.88-3.00(m)	1D
Aspartate	2.80 (dd, J=17.4, 3.9)	1D, COSY
Choline	3.19 (s)	1D, HSQC
Ethanol	1.17 (t, J=7.2)	1D
Fumarate	6.51 (s)	1D
Glucose	4.63 (d, J=7.8), 5.22 (d, J=3.6)	1D, HSQC
Glutamate	2.00-2.10 (m)	1D, COSY
Glutamine	2.06-2.20 (m), 2.38-2.50 (m)	1D
Glycine	3.56 (s)	1D
Glycolate	3.95 (s)	1D
Isoleucine	0.92 (t, J=7.2), 1.00 (d, J=7.2)	1D, HSQC
Leucine	0.95 (t, J=6.2)	1D
Malate	4.33 (d, J=7.8)	1D, COSY
Maltose	5.39 (d, J=3.6)	1D, COSY, HSQC
Methionine	2.66 (t, J=7.8)	1D, COSY
Pyruvate	2.36 (s)	1D
Succinate	2.42 (s)	1D
Sucrose	3.46 (t, J=9.6), 3.67 (s), 3.75 (t, J=9.6), 4.04 (t, J=8.6), 4.21 (d, J=8.7), 5.41 (d, J=3.6)	1D, COSY, HSQC
Threonate	4.00 (d, J=2.4)	1D, HSQC
Threonine	1.31 (d, J=6.6)	1D, COSY
Valine	0.98 (d, J=6.9), 1.03 (d, J=6.6)	1D

[0097]

[0099] 또한, 추가적으로 시료(한국산 및 중국산 폴링)에 대한 2D NMR 스펙트럼을 확인했을 때, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 2D ^1H - ^1H COSY 스펙트럼을 통해, 백미는 총 7개의 대사체(도 2a), 현미는 총 9개의 대사체(도 3a)가 확인되었고; ^1H - ^{13}C HSQC 스펙트럼을 통해, 백미는 총 6개의 대사체(도 2b), 현미는 총 7개의 대사체(도 3b)를 확인함으로써, 1D NMR에서 검출된 대사체들 정성 분석의 정확성을 입증하였다.

[0101] 1-4. 다변량 통계 분석

[0102] 본 발명자들은 SIMCA software를 이용하여 다변량 통계 분석을 실시하였다. 또한, 원산지 판별을 위한 최적의 분리 및 예측 model을 찾기 위해 다양한 데이터 처리조건(normalization, scaling 방법)을 비교하였다.

[0103] 그 결과, 한국과 중국 원산지 판별을 위한 최적의 OPLS-DA model로 백미는 total area normalization, UV scaling, 6 components; 현미는 standardized area normalization, UV scaling, 11 components로 지정한 모델이 선정되었다. 한국과 중국산 백미 또는 현미 분리를 위한 다양한 normalization, scaling 조건에 따른 OPLS-DA 모델 매개변수(parameter)는 표 3에 나타내었다.

[0104] 또한, 도 4a 및 5a에 나타난 바와 같이, 선정된 조건으로 설립된 OPLS-DA 모델의 score plot 상에서 백미(도 4a) 및 현미(도 5a) 모두 한국과 중국산 샘플이 predictive component 1을 기준으로 뚜렷하게 구분됨을 확인하였다.

[0106] [표 3]

Group No.	Normalization method	Scaling method	Component number	R ² Y	Q ² Y	R ² Y intercept	Q ² Y intercept
백미							
1	Standardized area	UV	2	0.396	0.060	0.028	-0.152
2		Par	-	-	-	-	-
3	Total area	UV	6	0.727	0.582	0.113	-0.294
4		Par	7	0.721	0.572	0.112	-0.269
현미							
1	Standardized area	UV	11	0.882	0.799	0.188	-0.447
2		Par	8	0.820	0.706	0.168	-0.334
3	Total area	UV	10	0.879	0.783	0.177	-0.441
4		Par	9	0.808	0.677	0.175	-0.366

[0107] UV, unit variance. Par, pareto

[0109] 또한, OPLS-DA 모델의 leave-one-out cross validation 및 민감도 (sensitivity), 특이도 (specificity) 및 정확도 (accuracy)를 산출하였다. 한국과 중국산 백미 또는 현미 원산지 판별을 위한 OPLS-DA 모델의 leave-one-out cross validation 매개변수(parameter)는 하기 표 4에 나타내었다.

[0110] 그 결과, 도 4b 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, 한국과 중국산 백미 또는 현미 분리 모델은 백미의 경우 민감도, 특이도 및 정확도가 86.7%, 98.9%, 및 97.1%의 값을 나타냈고(도 4b), 현미의 경우 민감도, 특이도 및 정확도가 97.8%, 100.0%, 및 98.9%의 값을 나타냈다(도 5b).

[0112] [표 4]

Class	Sensitivity %	Specificity %	Accuracy %
백미			
한국 vs 중국	86.7	98.9	97.1
현미			
한국 vs 중국	97.8	100.0	98.9

[0113]

[0115] 또한, 한국과 중국산 백미 또는 현미 원산지 분리에 기여하는 대사체 물질 확인을 위해 VIP(Variable Importance of Projection)를 분석하였다.

[0116] 그 결과, 백미의 경우, 하기 표 5에 나타낸 바와 같이, VIP 1.0 이상의 11개 대사체(succinate, pyruvate, methionine, alanine, sucrose, fumarate, glutamine, aspartate, glucose, glutamate, glycolate)를 바이오마커 후보로 선정하였고; 현미의 경우, 하기 표 6에 나타낸 바와 같이, VIP 1.0 이상의 5개 대사체 (choline, glucose, maltose, sucrose, acetate)를 바이오마커 후보로 선정하였다.

[0117] 즉, 상기 결과들은 본 발명의 바이오 마커에 의해 한국과 중국 내 백미 또는 현미가 뚜렷하게 분리됨을 제시한다.

[0118] [표 5]

No.	Compounds	VIP value
1	Succinate	1.554
2	Pyruvate	1.534
3	Methionine	1.482
4	Alanine	1.377
5	Sucrose	1.369
6	Fumarate	1.320
7	Glutamine	1.277
8	Aspartate	1.237
9	Glucose	1.210
10	Glutamate	1.108
11	Glycolate	1.080
12	Threonine	0.998
13	Asparagine	0.984
14	4-Aminobutyrate	0.867
15	Valine	0.707
16	Maltose	0.637
17	Malate	0.560
18	Isoleucine	0.478
19	Glycine	0.428
20	Leucine	0.276
21	Ethanol	0.262
22	Choline	0.088
23	Acetate	0.063
24	Threonate	0.045

[0119]

[0120] [표 6]

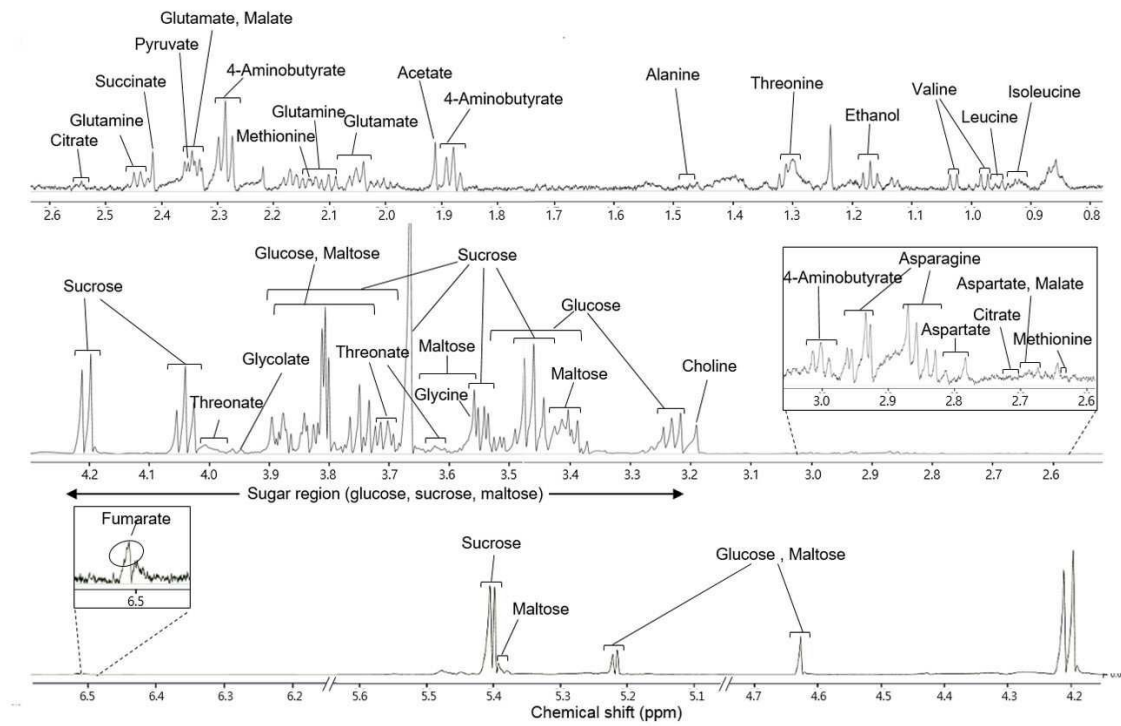
No.	Compounds	VIP value
1	Choline	2.153
2	Glucose	2.120
3	Maltose	1.984
4	Sucrose	1.909
5	Acetate	1.163
6	Fumarate	0.925
7	Alanine	0.878
8	Ethanol	0.809
9	Glycine	0.720
10	Pyruvate	0.708
11	Glutamine	0.638
12	Threonate	0.631
13	4-Aminobutyrate	0.611
14	Succinate	0.608
15	Glutamate	0.593
16	Isoleucine	0.584
17	Methionine	0.408
18	Leucine	0.372
19	Malate	0.195
20	Threonine	0.152
21	Valine	0.132
22	Glycolate	0.078
23	Asparagine	0.040
24	Aspartate	0.006

[0121]

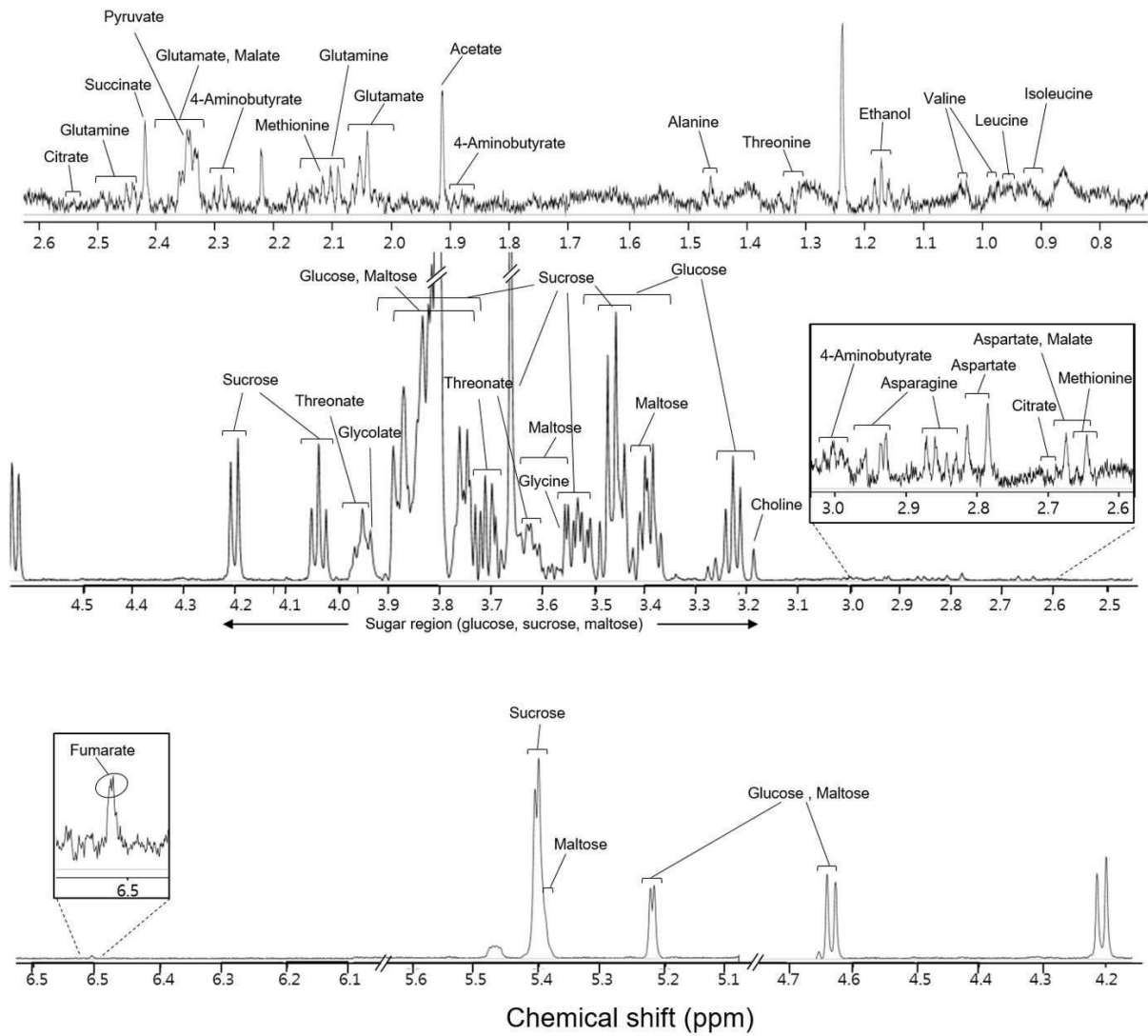
[0123] 결론적으로, 본 발명을 통해 선정된 백미 또는 현미 원산지 판별 대사체 마커들은 신속하고 높은 정확도로 수입산, 특히, 중국산의 백미 또는 현미를 구별할 수 있으며, 향후 국내 백미 또는 현미 산업 유통체계의 혼란을 막는데 도움을 줄 수 있는 바이오마커 개발의 초석이 될 것으로 사료된다.

도면

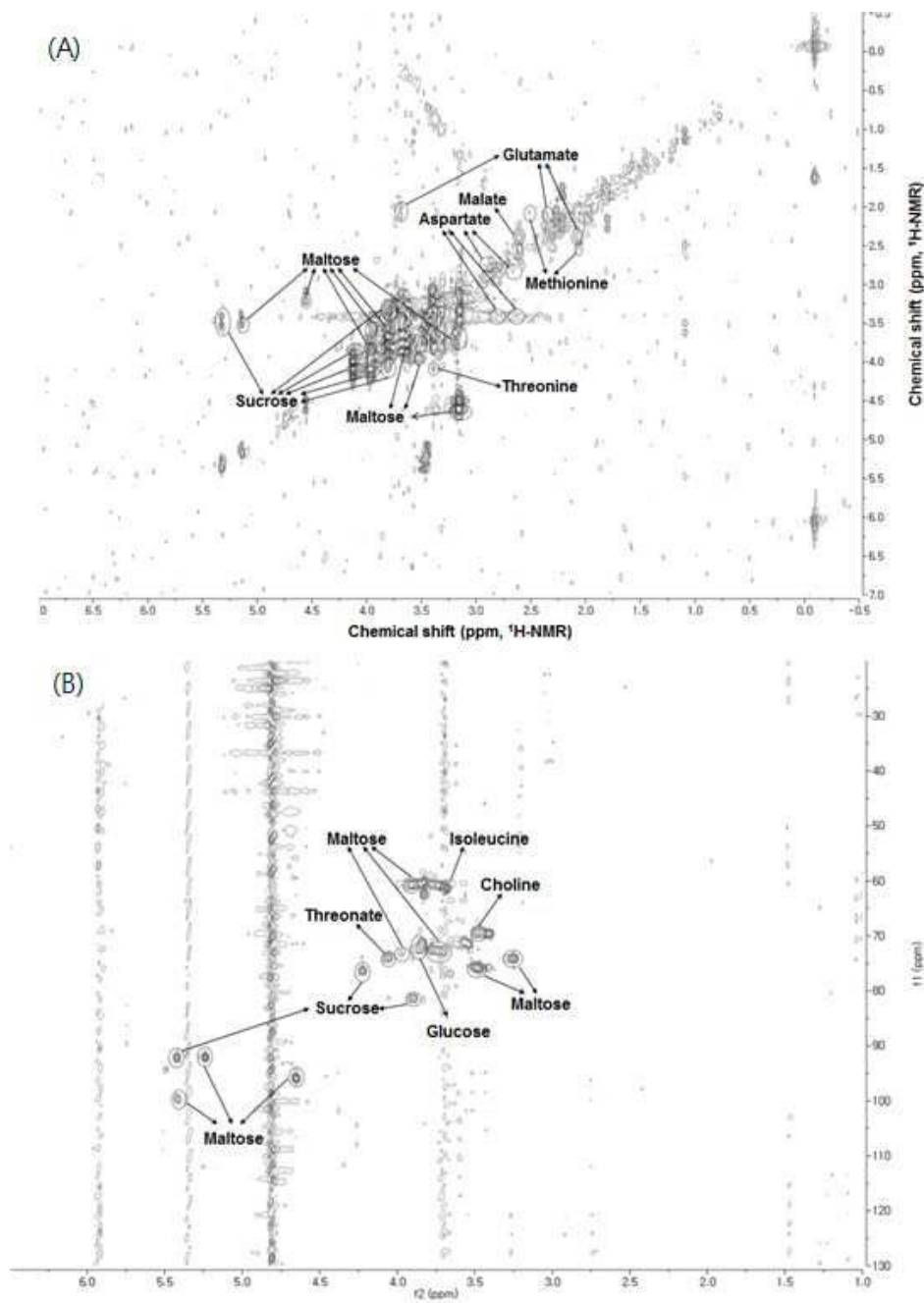
도면1a



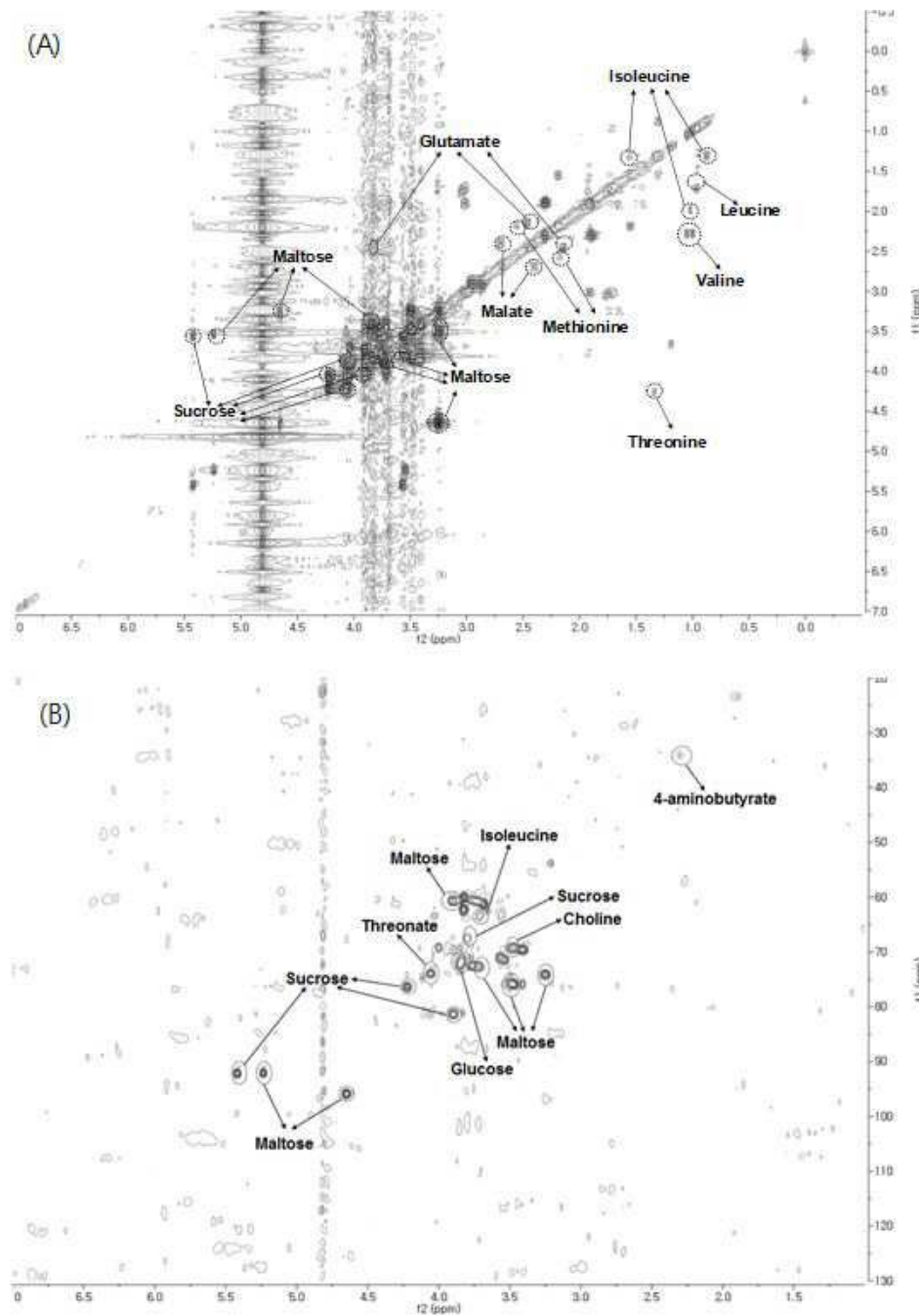
도면1b



도면2

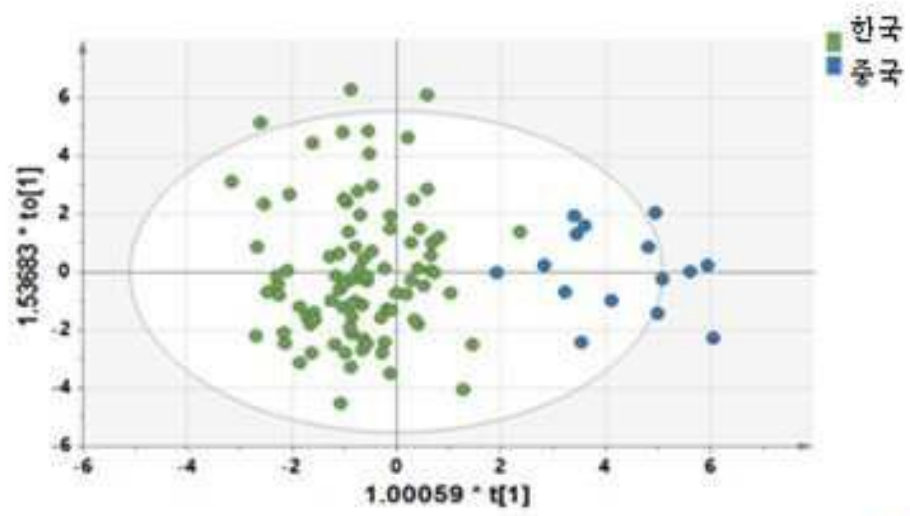


도면3

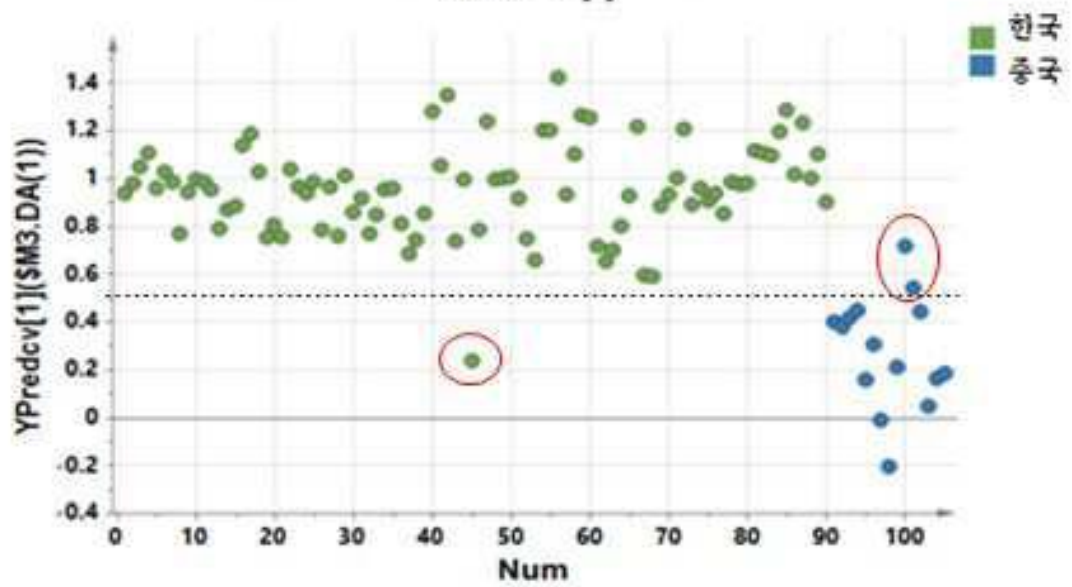


도면4

(A)

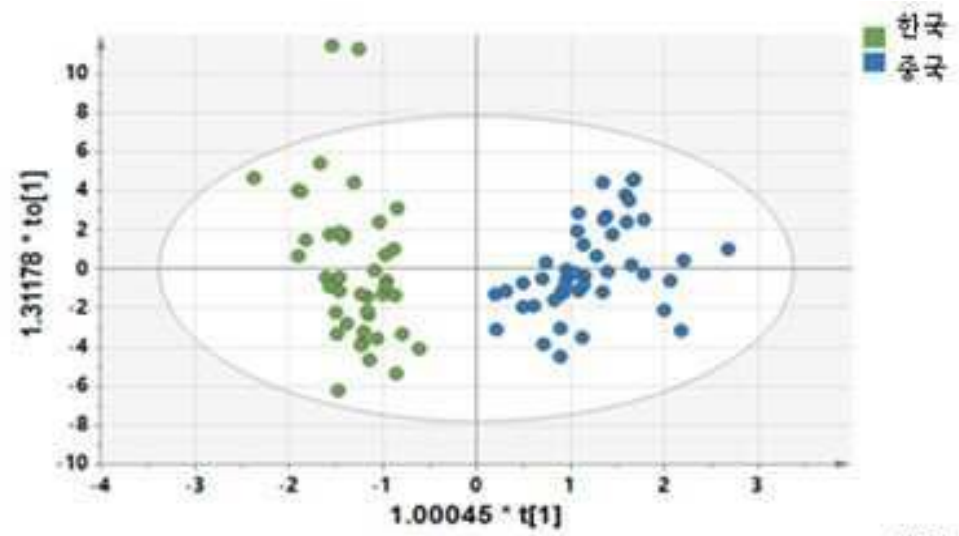


(B)



도면5

(A)



(B)

