(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0042476
(43) 공개일자 2019년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/02 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/02 (2013.01)
G01N 30/7206 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0123243
(22) 출원일자 2018년10월16일
심사청구일자 2018년10월16일
(30) 우선권주장
1020170134118 2017년10월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이도엽
서울특별시 노원구 중계로8길 29, 104동 301호(중계동, 한화꿈에그린아파트)
이은미
경기도 부천시 평천로 616, 2112동 1302호(상동, 다정한마을 삼성래미안아파트)
김영석
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 208동 1801호(식사동, 위시티일산자이2단지아파트
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 6 항

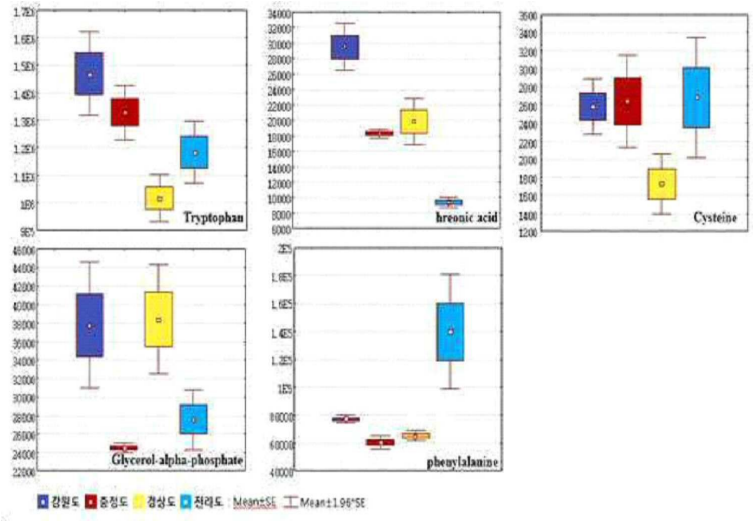
(54) 발명의 명칭 **대두의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법**

(57) 요 약

본 발명은 대두의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법에 관한 것이다.

본 발명의 대두의 원산지 판별용 바이오마커를 이용하면, 대두 내 대사체의 수준변화를 이용하여 국내 4개의 도에서 재배되는 대두의 원산지를 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 시장 질서 확립과 소비자들의 신뢰 확보에 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
G01N 2030/8809 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 316081-04
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 첨단생산기술개발사업
연구과제명 농산물 원산지 판별을 위한 대사체 지문 활용 플랫폼 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교
연구기간 2016.09.05 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cysteine), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)로 이루어진 군으로부터 선택된 3 종 이상의 대사체를 포함하는, 대두의 국내 원산지 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 국내 원산지는 강원도, 충청도, 경상도 및 전라도로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 대두의 국내 원산지 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항의 대두 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 포함하는, 대두의 국내 원산지 판별용 키트.

청구항 4

다음 단계를 포함하는 대두의 국내 원산지 판별방법:

(a) 대두로부터 대사체를 추출하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 추출된 대사체 중 트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cysteine), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)로 이루어진 군으로부터 선택된 3 종 이상의 대사체를 기체 크로마토그래피-질량분석기로 분석하는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 국내 원산지는 강원도, 충청도, 경상도 및 전라도로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 대두의 국내 원산지 판별방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 (b) 단계의 대사체들 간의 발현 수준 차이로 원산지를 판정하는 것을 특징으로 하는, 대두의 국내 원산지 판별방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대두의 원산지 판별용 바이오마커 및 이를 이용한 원산지 판별방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 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」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. 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. 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 사회문제로 대두되고 있으며, 과학적이고 객관적인 판별법의 확보가 시급한 실정이다.

[0004] 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 접근방법으로써 한계점이 있다.

[0005] 한편, 대사체학(metabolomics)은 농산물에 존재하는 대사체(metabolites) 들을 분석, 연구하는 학문으로 정의한다. 또한 대사체학은 농산물 내 전대사체(metabolome)를 비표적적인(non-targeted) 방식으로 분석하는 접근방법이며, 유전적 차이나 환경적 변화에 대한 차이를 효율적으로 규명할 수 있어서 대사체학을 활용한 농산물 및 약용작물의 원산지 판별에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

[0006] 2010년도 이후 농산물품질관리원에서 주로 유전체 정보를 활용한 단일염기다형성마커을 이용하여 곶감, 구기자, 쌀 등의 원산지 판별을 위한 키트를 개발하여 특허를 출원 중에 있거나 등록하였으나, 대사체를 이용해 국내에서 재배되는 대두의 원산지를 판별하는 연구는 아직 이루어지지 않은 상태이다. 또한 현재 우리나라의 대두 소비는 대부분 수입에 의존하고 있어 원산지를 명확하게 할 필요성이 있다.

[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 전술한 바와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 대사체를 이용해 국내에서 재배되는 대두의 원산지를 판별하는 방법을 개발하고자 하였다. 그 결과, 대두 내 대사체인 트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cysteine), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)의 발현 수준 차이를 이용하여, 국내에서 재배되는 대두의 원산지를 신속 정확하게 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 일 목적은, 대두의 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는 대두의 원산지 판별용 키트를 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 대두의 원산지 판별용 바이오마커를 이용하여 대두의 원산지를 판별하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cysteine), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)로 이루어진 군으로부터 선택된 3 종 이상의 대사체를 포함하는 대두의 국내 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 대두의 국내 원산지 판별용 바이오마커는 원산지별 대두의 대사체의 발현 수준 차이를 이용하여 대두의 원산지를 판별할 수 있는 것을 특징으로 한다. 상기 대사체의 발현 수준은, 구체적으로, 국내 강원도, 충청도, 경상도 및 전라도 중에서 가장 많이 고발현 또는 저발현되는 것으로 이해되어야 한다.

[0017] 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.

[0018] 본 명세서에서 사용된 용어 "대두"는, "콩"이라고도 호칭되며, 콩과의 1년초 또는 그 종자를 의미한다. 대두는 콩과식물 중 가장 영양분이 많고 소화하기 쉬운 식량으로써 단백질이 풍부하며 값싸게 얻을 수 있는 단백질 공급원 중의 하나이다. 대두에는 수분 8.6%, 단백질 40%, 지방 18%, 섬유질 3.5%, 회분 4.6%, 펜토산 4.4%, 당분 7% 등이 함유되어 있으며 노란색 대두 껍질에는 이소플라본(Isoflavone)계 색소가 있다. 대두에 함유되어 있는 필수지방산인 리놀레산(Linoleic aicd)은 인체의 구성 성분을 이루는 외에도 혈관벽에 붙은 콜레스테롤(Cholesterol) 제거에 효과가 있으며 레시틴(Lecithin)도 이와 같은 효과가 있어서 이 두 성분은 동맥경화를 예방하는데 효과가 있다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 용어 "판별"은, 대두의 원산지가 어느 곳인지 결정하여 구별하는 것을 의미한다.

[0020] 본 명세서에서 사용된 용어 "수준 차이"는, 대두에서의 특정 대사체를 비교하고자 하는 그룹 간에서의 대사체 수준이 높거나 혹은 낮은 것을 의미한다.

[0021] 본 명세서에서 사용된 용어 "대두 원산지 판별용 바이오마커"는 원산지로부터의 대두 내에 트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cysteine), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)인 대사체들이 발현되어 상기 대사체들의 발현 수준을 이용하여 원산지를 판별할 수 있는 바이오마커로 사용할 수 있다는 뜻이다.

[0022] 상기 대두 원산지 판별용 바이오마커로 트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cysteine), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)을 단독 또는 3 종 이상 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 대두 원산지 판별용 바이오마커 조성물은, 바람직하게는 트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cysteine), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)으로 이루어진 군에서 선택된 4 종 이상을 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 5 종을 모두 포함할 수 있다. 5 종을 모두 포함하는 대두 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 사용할 경우 강원도, 충청도, 경상도 및 전라도 지역에서 생산되는 대두 원산지를 보다 정확하게 판별할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서는 최초 동정된 94 종 중 10 종을 모두 포함하는 대두 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 사용할 경우 유의성있는 판별 효과가 없음을 확인함으로써, 본 발명의 5 종을 모두 포함하는 대두 원산지 판별용 바이오마커 조합이 최적임을 확인하였다.

[0025] 또한, 상기 원산지는 강원도, 충청도, 경상도 및 전라도로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0026] 또한, 상기 조성물은 대두 내 대사체의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함할 수 있으며, 상기 제제는 4 개의 지역으로부터 생산된 대두 시료에서 대사체 각각의 수준을 측정할 수 있다.

[0027] 예컨대, 강원도산 대두는 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이

용되는 경우, 강원도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 1.17:1.53:1.07:1.18:0.90이다.

[0028] 충청도산 대두는 대사체인 트립토판, 트레온산 및 시스테인과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 충청도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 1.06:0.95:1.10:0.76:0.71이다.

[0029] 경상도산 대두는 대사체인 트레온산 및 글리세롤-알파-포스페이트과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 트립토판, 시스테인 및 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 경상도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 0.81:1.03:0.72:1.20:0.76이다.

[0030] 전라도산 대두는 대사체인 시스테인 및 페닐알라닌과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 트립토판, 트레온산 및 글리세롤-알파-포스페이트는 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 강원도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 0.95:0.49:1.11:0.86:1.63이다.

[0032] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 대두의 국내 원산지 판별용 바이오마커 조성물을 포함하는, 대두의 국내 원산지 판별용 키트를 제공한다.

[0033] 본 발명의 대두의 국내 원산지 판별용 키트는 원산지가 의심되는 대두시료로부터 상기 대사체를 검출하거나 정량분석하여 대두시료의 원산지를 판별하는데 사용될 수 있으며, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0034] 또한, 상기 대두의 국내 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.

[0035] 본 발명의 대두의 국내 원산지 판별용 키트는 상술한 3 종 이상의 바이오마커를 포함하여 시료의 대사체를 정량분석함으로써 대두의 원산지를 판별할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0036] 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 대두 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.

[0037] 따라서, 상기 지지체는 높은 수준의 다공도를 가진 임의의 지지체일 수 있으며, 이러한 지지체는 종래 기술분야에서 공지되어 있으며, 또는 상업적으로 구입 가능하다.

[0038] 구체적으로, 고형 지지체일 수 있다. 보다 구체적으로는 액체에 대한 흡수성 물질로 이루어져 있다. 상기 흡수성 물질은 흡착제 또는 흡착성 물질일 수 있다.

[0039] 상기 액체 흡수성 물질은 바이오마커의 용액과 분석용 후속 시료가 기공을 통해 일정하게 흡착 또는 흡수되게 한다.

[0040] 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, 덱스트란, 키토산 또는 곤약과 같은 카보하이드레이트 물질이나 그 유도체, 카나기난, 젤란 또는 알기네이트를 포함할 수 있다. 가장 구체적으로는, 셀룰로오스 또는 유리 섬유일 수 있다.

[0041] 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.

[0042] 또한, 본 발명의 키트에 사용할 수 있는 시료는 대두 원산지별 대사체 추출물로서, 액체 시료의 형태로 키트에 제공될 수 있다.

[0043] 상기 대사체의 추출방법은 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 용매추출법을 이용한다. 상기 용매는 대두의 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.

[0044] 예컨대, 상기 대사체 추출물은 메탄올 및 물의 혼합용매, 구체적으로 1:1 내지 9:1의 부피비, 보다 구체적으로는 7:3의 부피비로 혼합한 혼합용매에서 대두를 균질화하여 얻을 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0045] 또한, 대사체의 추출 범위를 보다 넓게 하기 위해 상기 용매 내에서 대두 시료를 균질화하는 과정을 추가적으로 실시할 수 있다.

[0046] 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.

[0047] 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.

[0048] 본 발명의 키트는 상술한 조성물을 이용하므로, 상술한 바와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0050] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 대두의 국내 원산지 판별방법을 제공한다:

[0051] (a) 대두로부터 대사체를 추출하는 단계; 및

[0052] (b) 상기 (a) 단계에서 추출된 대사체 중 트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cysteine), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)로 이루어진 군으로부터 선택된 3 종 이상의 대사체를 기체 크로마토그래피-질량분석기로 분석하는 단계.

[0053] 상기 원산지는 강원도, 충청도, 경상도 및 전라도로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상이다.

[0054] 바람직하게는, 상기 (b) 단계의 대사체들 간의 발현 수준 차이로 원산지를 판정한다.

[0055] 예컨대, 강원도산 대두는 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 강원도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 1.17:1.53:1.07:1.18:0.90이다.

[0056] 충청도산 대두는 대사체인 트립토판, 트레온산 및 시스테인과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 충청도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 1.06:0.95:1.10:0.76:0.71이다.

[0057] 경상도산 대두는 대사체인 트레온산 및 글리세롤-알파-포스페이트과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 트립토판, 시스테인 및 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 경상도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 0.81:1.03:0.72:1.20:0.76이다.

[0058] 전라도산 대두는 대사체인 시스테인 및 페닐알라닌과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 트립토판, 트레온산 및 글리세롤-알파-포스페이트는 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 강원도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 0.95:0.49:1.11:0.86:1.63이다.

[0059] 본 발명의 일 구현예에서, 하기와 같은 방법으로 서로 다른 원산지의 대두 시료 간의 대사체의 차별성을 판별한다:

[0060] (1) 국내 4개의 지역에서 차이를 보이는 5가지 대사체(Tryptophan, Threonic acid, Cysteine, Glycerol-alpha-

phosphate, Phenylalanine)를 선별 후, 선별된 대사체에 대해 직교부분최소제자승판별(OPLS-DA)를 이용하여 다변량 방식으로 반응 변수 모형화;

[0061] (2) GC/TOF MS에서 분석된 대사체의 강도를 이용하여 상대적 수준 차이 비교;

[0062] (3) ROC 곡선 (Receiver Operating Characteristic curve)을 이용하여 대사체 바이오마커를 검증하는 방법을 순차적으로 적용하여 AUC(Area Under the Curve) 값 비교; 및

[0063] (4) ROC 곡선(Receiver Operating Characteristic curve)을 이용하여 대사체 바이오마커를 검증을 통하여 대두 시료로부터 대사체 바이오마커 분석.

[0064] 상기 대두시료에서 대사체의 수준차이를 측정하는 방법은 질량분석기(Mass Spectrometer), 크로마토그래피(Chromatography) 기기, 크로마토그래피가 결합된 질량분석기(Chromatography- mass spectrometer), 핵자기공명분광분석기(Nuclear Magnetic Resonance spectrometer), 라만 분광기(Raman spectroscopy), 광흡수분석(light absorption analysis)기, 유동주입분석(flow injection analysis)기 등의 기기장치를 이용한 분석법; 상기 대사체에 특이적인 항체, 엡타머, 펩타이드, 핵산 또는 고분자와 대사체 간의 특이적인 결합을 이용한 대사체의 정량분석법; ELISA(enzyme linked immunosorbent asay), 웨스턴 블랏, 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter) 또는 마이크로어레이(microarray) 분석법 등의 방법을 이용하여 수행할 수 있으며, 이에 제한하지 않는다. 바람직하게는, 상기 대사체의 수준을 측정하는 방법으로 기체 크로마토그래피 분석법 및 질량분석법을 사용할 수 있다.

[0065] 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피(Chromatography)는 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography), 액체-고체 크로마토그래피 (Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이 크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피 (Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 포말 크로마토그래피(Foam Chromatography, FC), 유화 크로마토그래피(Emulsion Chromatography, EC), 기체-액체 크로마토그래피(Gas-Liquid Chromatography, GLC), 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC), 겔 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatograhy, GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)를 포함하며, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 가스 크로마토그래피이다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 질량분석기는 MALDI-TOF MS 또는 TOF MS이고, 보다 바람직하게는 TOF MS이다.

[0066] 또한, 상기 기기장치를 이용한 분석법을 수행할 경우, 상기 대두시료로부터 대사체를 추출하여 수득하고, 추출된 대사체에 메톡시아민을 처리하여 유도체화하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명의 다른 구현예에서, 하기와 같은 방법으로 서로 다른 원산지의 대두 시료 간의 대사체의 차별성을 판별한다: 먼저, 대두의 원산지 판별의 바이오마커를 스크리닝하기 위해 국내 4개의 도에서 재배된 대두 시료를 확보하여 대사체를 추출하였다. 그 용매는 메탄올:아이소프로판올:증류수 (3:3:2)를 사용하며, 추출된 샘플은 효과적인 Mass spectrometer 분석을 위해, pyridine, MSTFA 유도체화를 실시하였다. 내부 보유 마커로는 13가지 다른 지방산메틸에스터를 첨가하였다.

[0068] 그 후, GC/TOF MS를 이용하여 대사체 프로파일의 차이를 비교, 분석하였다. 이를 위하여 분석결과를 통계처리 가능한 수치로 변화한 다음, 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 그 차별성을 검증하였다. 그 결과 94종의 대사체를 동정하였고 표준화를 위하여 GC/TOF MS 분석결과 나온 강도를 대사체의 강도 합으로 나누는 방법을 사용하였고, 추가적으로 변위차 표준화법을 실시하였다.

[0069] 또한, 그룹 간 차이를 보이는 단일 바이오마커 후보를 탐색하기 위하여, (1) 주성분 분석(PCA); (2) 직교부분최소자승판별 분석(OPLS-DA)을 통한 VIP 순위 탐색; (3) 아노바 (ANOVA)분석에서의 공통 대사체를 후보로 검증하였다. 또한 이들의 다양한 조합을 통하여 복합 바이오마커를 탐색하였다. 이는 직교부분최소자승판별 분석(OPLS-DA)을 통하여 다변량 방식으로 반응 변수를 모형화 및 주성분분석과 같은 성분을 추출해 낼 수 있다.

[0070] 또한, ROC 분석을 통해 총 6개의 단일 대사체 후보와 그의 42가지 조합을 확인 한 결과 4개의 그룹 사이의 AUC 값이 모두 0.7 이상으로 확인되었다. 또한 보다 높은 AUC 값(질병의 판정을 위한 AUC 값 > 0.8)을 도출하기 위한 분석을 추가하여 실시하였다.

[0071] 또한, 각 그룹별 t-검정을 통하여 그룹에 특이적인 대사체를 확인할 수 있었다. 대사체의 유의적 차이의 크기를 폴드 체인지로 비교하여 (fold changd) 그 양이 증가 혹은, 감소하는 패턴을 분석하여, 그룹 특이적 대사체를 선별하였다.

[0072] 이 중 새롭게 선별된 5가지 대사체(Tryptophan, Threonic acid, Cysteine, Glycerol-alpha-phosphate, Phenylalanine)를 국내 4개의 도에서 재배되는 대두의 원산지를 판별할 수 있는 바이오 마커로 선정하였고, 특정 지역에서 보다 일관성 있고 신뢰도 높은 정확한 판별을 가능하게 함으로써 실제 원산지 단속에 적용 가능하도록 하였다.

[0073] 따라서, 본 발명의 대두의 원산지 판별용 바이오마커를 이용한 대두의 원산지 판별방법을 이용하였을 때, 보다 일관성 있고 신뢰도 높게 대두의 원산지를 판별할 수 있음을 확인하였다. 또한, 이는 실제 원산지 단속에 적용할 수 있으며, 대두 외 다양한 농산물에도 적용할 수 있다.

발명의 효과

[0075] 본 발명의 대두의 원산지 판별용 바이오마커를 이용하면, 대두 내 대사체의 수준변화를 이용하여 국내 4개의 도에서 재배되는 대두의 원산지를 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 1은 질량 분석을 통해 나온 결과를 주성분분석(principal component analysis, PCA) 을 이용하여 분석한 결과로, 국내 4개의 도에서 재배되는 대두 시료에서 검출된 대사체들의 차이를 나타낸 도이다.

도 2는 직교부분최소자승판별 분석(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 결과로, 국내 4개의 도에서 재배되는 대두 시료에서 검출된 대사체들의 차이를 나타낸 도이다.

도 3은 계층적 군집 분석(Hierarchical clustering analysis, HCA)을 토대로 상대 존재비(Relative abundances)를 나타낸 결과로, 국내 4개의 도에서 재배되는 대두의 원산지를 판별해 낼 수 있는 최소한의 대사체 5가지(Tryptophan, Threonic acid, Cysteine, Glycerol-alpha-phosphate, Phenylalanine)를 선택하고 각각의 수치를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에서 선별한 5 가지 대사체를 이용하였을 때 각각의 지역에 대한 판별 결과를 나타내는 AUC curve 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 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.

[0080] **실시예 1. 시료 내 대사체 추출 및 유도체화**

[0081] **1-1. 대두 시료의 전처리 및 대사체 추출**

[0082] 강원도, 충청도, 경상도 및 전라도 지역의 대두 시료는 국립농산물품질관리원에서 제공받았으며, 대두 콩 7 g을 균질화하여 파우더 형태로 만든 후 대사체 추출 전까지 영하 80℃에서 냉동 보관하는 방법으로 전처리하였다.

[0083] 대두 시료 내 대사체 추출을 위해, 상기 냉동 보관 되어 있는 대두 파우더를 20 ㎎씩 튜브에 담은 후 1 ㎖의 추출용제 (메탄올:이소프로프라놀:증류수, 3:3:2, v/v/v)를 첨가하였다. 이 혼합물을 4℃에서 10분간 초음파 분쇄한 후, 5분간 13,200 rpm 으로 원심분리하여 850 ㎕의 상등액을 다른 튜브에 담고 고속진공농축기(speed vacuum concentrator)를 사용하여 건조시켰다. 건조된 추출물은 GC-TOF 질량 분석기로 분석할 때까지 -80℃에서 냉동 보관하였다.

[0085] **1-2. 대사체의 유도체화**

[0086] 상기 실시예 1-1에서 추출한 대두의 대사체 샘플의 더욱 효과적인 분석을 위해 유도체화를 실시하였으며, 이를 위해 우선 40 mg/ml 농도의 메톡시아민 염산 (methoxyamine hydrochloride) 5㎕를 첨가하고 90분간 반응하였다 (200rpm, 30℃). 그 후, 지방산 메틸에스테르 (Fatty acid methyl esters: FAME, C8, C9, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28 및 C30)를 이용하여 머무름 시간 색인지표(internal retention index markers)의 혼합물을 합성하고, C8-C16과 C18-C30은 각각 0.8 mg/ml와 0.4 mg/ml 농도의 클로로포름에 융해시킨 후, 지방산 메틸에스테르 2㎕, N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA + 1% TMCS, Thermo, USA) 45㎕를 추가하여 200 rpm, 37℃의 조건으로 1시간동안 반응하였다.

[0088] **실시예 2. 대사체 검출 및 분석**

[0089] **2-1. 기체 크로마토그래피 분석**

[0090] 대두 시료에서 추출한 샘플 내 대사체 검출을 위해, 상기 실시예 1-2에서 유도체화한 대사체 샘플 0.5 ㎕를 Automatic Liquid Sampler(Agilent 7693 ALS, Agilent Technologies, Wilmington, DE)를 이용해 기체 크로마토그래피에 주입하였다. 기체 크로마토그래피는 Agilent 7890B gas chromatograph(Agilent Technologies, Wilmington, DE)과 RTX-5Sil MS column(30 m x 0.25 mm, 0.25 ㎛ film thickness, Restek, Gellefonte, PA)을 이용하였고 첫 1분은 50℃로, 이후 분당 20℃씩 온도를 상승시켜 330℃에 도달한 후 5분 동안 유지하였다. 기체 크로마토그래피의 전재선 (transfer line) 온도는 280℃로 설정하였다.

[0092] **2-2. 질량 분석기 분석**

[0093] 또한 대두 시료에서 추출한 샘플 내 대사체 검출을 위해 질량 분석기를 이용하여 질량 분석을 실시하였다. 질량 분석에는 Pegasus HT time of flight (TOF) MS software 4.50 (LECO, St. Joseph, MI) 프로그램을 기반으로 한 Pegasus HT TOF 질량 분석기를 이용하였으며, 85-500m/z의 질량 범위에서 초당 20 스펙트럼의 속도로 대사체들의 질량 스펙트럼을 확보하였다. 이온소스 (ion source) 의 온도는 250℃로 조정하였으며, 전자 충격 이온화 (electron impact ionization) 는 70 eV로 시행하였다.

[0095] **2-3. 대사체 초기동정**

[0096] 상기 2-1 및 2-2에서 분석한 대사체들의 초기동정(annotation)을 위해 Fiehn 라이브러리(2007)/NIST 라이브러리(2012)를 사용하여 스펙트럼(spectrum)의 일치도를 통한 비교분석을 실시하였으며, 이후 표준물질의 스펙트럼(spectrum)과 머무름시간 (retention time) 직접적 비교를 통한 검증을 하였다. 결과적으로 상기 과정들을 통해 대두 시료에서 총 94개의 대사체들을 검출하였다(표 1).

표 1

[0098]

Compounds	Compounds	Compounds
1-deoxyerythritol	glucose	ornithine
1-monopalmitin	glucose-6-phosphate	oxalic acid
2-deoxyerythritol	glutamine	oxoproline
2-hydroxypyridine	glyceric acid	palmitic acid
2-monopalmitin	glycerol	phenylalanine
3-hydroxypropionic acid	glycerol-alpha-phosphate	phosphoethanolamine
3-hydroxypyridine	glycine	pinitol
3-phenyllactic acid	glycolic acid	proline
3-phosphoglycerate	guanine	propane-1,3-diol
6-chlorohexanol	guanosine	pyrophosphate
adenosine-5-monophosphate	heptadecanoic acid	pyruvic acid
Alanine	hexitol	ribitol

asparagine	homoserine	ribose
asparagine dehydrated	hydroxylamine	serine
Aspartate	inositol-4-monophosphate	sorbitol
beta alanine	isoleucine	stearic acid
butane-2,3-diol	isothreonic acid	succinic acid
butyrolactam	lactic acid	sucrose
Cellobiose	lactitol	threonic acid
cholesterol	lysine	threonine
citric acid	lyxitol	trehalose
Citrulline	lyxose	trehalose-6-phosphate
Cysteine	malic acid	tris(ethylenglycol)
enolpyruvate	maltotriose	tryptophan
Erythritol	melibiose	tyrosine
ethanolamine	methionine	uracil
ethanol phosphate	methionine sulfoxide	uridine
Fructose	myo-inositol	valine
fumaric acid	nicotinic acid	xanthine
Galactinol	n-methylalanine	xylose
gamma-aminobutyric acid	norvaline	
gluconic acid	oleic acid	

[0100] **실시예 3. 대사체 바이오마커 선별**

[0101] **3-1. 주성분 분석(principal component analysis, PCA)**

[0102] 상기 실시예 1 및 2의 과정을 통해 검출한 총 94개의 대사체들 중 바이오마커 선별을 위한 분석으로 우선, 주성분 분석(principal component analysis, PCA)을 통해 검출한 대사체들을 도식화하였고 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0103] 도 1에서 보는 바와 같이 지역별로 대두 시료 내 대사체 분포에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

[0105] **3-2. 직교부분최소자승판별 분석(orthogonal partial least squares discriminant analysis , OPLS-DA)**

[0106] 또한, 국내의 재배되는 지역에 따른 대사체의 분포를 확인하기 위해 직교부분최소자승판별 (orthogonal partial least squares discriminant analysis , OPLS-DA) 분석을 시행하였고 이에 대한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0107] 도 2에서 보는 바와 같이 지역별로 대두 시료 내 대사체 분포에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

[0109] **3-3. 계층적 군집 분석(Hierarchical clustering analysis, HCA)**

[0110] 또한, 검출한 대사체들의 통계 분석을 위해, Multi Experiment Viewer (MeV, ver.4.8.1)을 이용한 계층적 군집 분석(Hierarchical clustering analysis, HCA)을 실시하였다. 그 후, 분석 결과를 바탕으로 통계적으로 식별 가능한 대사체들을 선별하여 상대 존재비(Relative abundances)를 분석하였고 이를 도 3에 나타내었다.

[0111] 도 3에서 보는 바와 같이 각 지역별로 5 가지 대사체 트립토판(Tryptophan), 트레온산(Threonic acid), 시스테인(Cystein), 글리세롤-알파-포스페이트(Glycerol-alpha-phosphate), 페닐알라닌(Phenylalanine) 대사체의 분포에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 이들을 대사체 바이오마커로 선별하였다.

[0112] 보다 상세하게는, 강원도산 대두는 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 강원도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 1.17:1.53:1.07:1.18:0.90이다.

[0113] 충청도산 대두는 대사체인 트립토판, 트레온산 및 시스테인과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되

는 경우, 충청도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 1.06:0.95:1.10:0.76:0.71이다.

[0114] 경상도산 대두는 대사체인 트레온산 및 글리세롤-알파-포스페이트과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 트립토판, 시스테인 및 페닐알라닌은 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 경상도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 0.81:1.03:0.72:1.20:0.76이다.

[0115] 전라도산 대두는 대사체인 시스테인 및 페닐알라닌과 같은 물질들은 많이 포함되어 있으나, 이에 비해 트립토판, 트레온산 및 글리세롤-알파-포스페이트는 상대적으로 적게 포함되어 있다. 본원발명의 바이오마커로서 이용되는 경우, 강원도산 대두 내 대사체인 트립토판, 트레온산, 시스테인, 글리세롤-알파-포스페이트 및 페닐알라닌의 분포 비율은 0.95:0.49:1.11:0.86:1.63이다.

[0117] **실시예 4. 대사체 바이오마커 검증 및 확립**

[0118] 상기 실시예 3에서 선별한 대사체 바이오마커를 검증 및 확립하기 위해, 선별된 대사체 바이오마커를 이용한 모델을 적용하였고 이 때 각각의 지역들에 대한 판별능력을 ROC curve 로 나타내었으며, 이를 도 4에 나타내었다.

[0119] 도 4에서 보는 바와 같이 AUC 값이 강원도, 충청도, 경상도, 전라도 모두에서 1로 나타났고, 선별된 바이오마커의 대두 지역별 판별력이 매우 높음을 확인하였다.

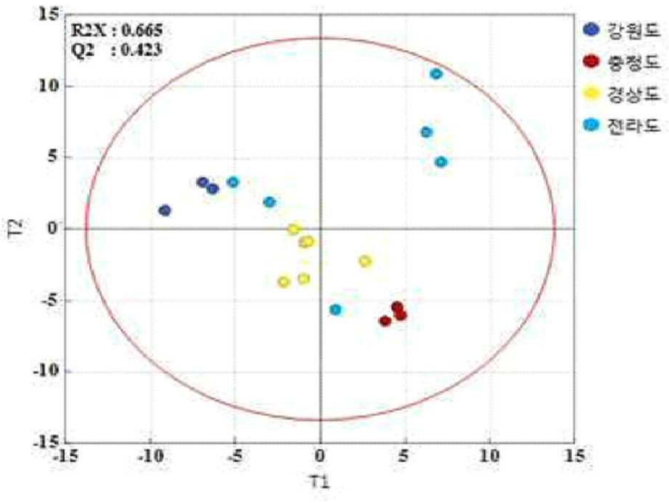
[0121] 또한, 대사체 바이오마커의 최적 조합을 확립하기 위하여, 상기 94 개 대사체 후보들 중 선택한 10 종(도 5a), 본 발명의 선별된 바이오 마커 대사체 5 종(도 5b) 및 상기 94 개 대사체 후보들 중 선택한 3 종(도 5c)에 대하여 각각의 지역들에 대한 판별능력을 ROC curve 로 나타내었으며, 이를 도 5에 나타내었다.

[0122] 도 5에서 보는 바와 같이, 본 발명의 선별된 바이오 마커 대사체 5 종으로 조합한 경우 최적의 조합으로서, AUC 값이 강원도, 충청도, 경상도, 전라도 모두에서 1로 나타났고, 선별된 바이오마커의 대두 지역별 판별력이 매우 높음을 확인하였다.

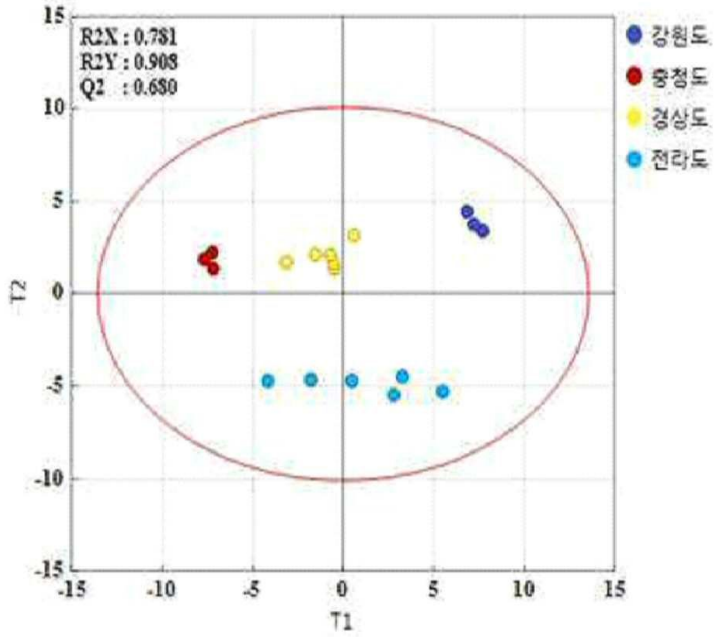
[0124] 결론적으로, 본 발명을 통해 선정된 대두 원산지 판별 대사체 마커들은 신속하고 높은 정확도로 국내 대두 원산지를 판별할 수 있으며, 향후 국내 대두 산업 유통체계의 혼란을 막는데 도움을 줄 수 있는 바이오마커 개발의 초석이 될 것으로 사료된다.

도면

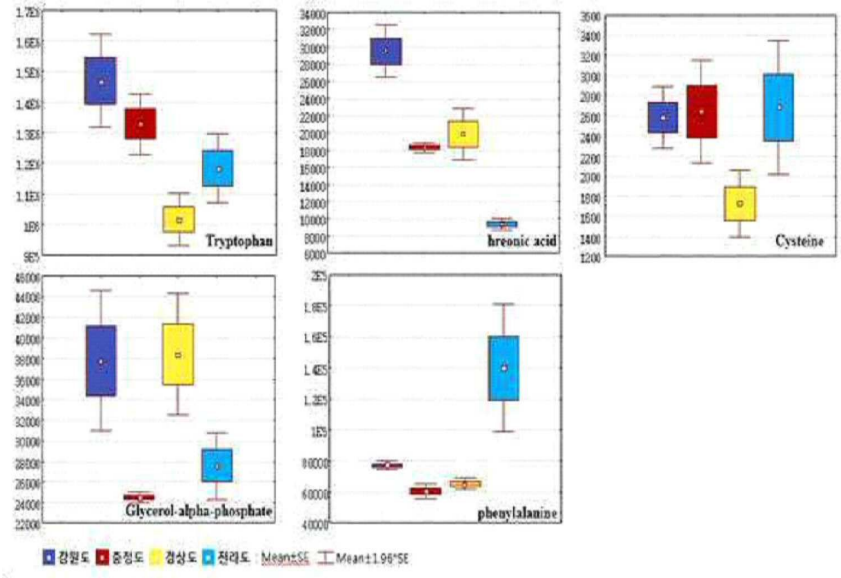
도면1



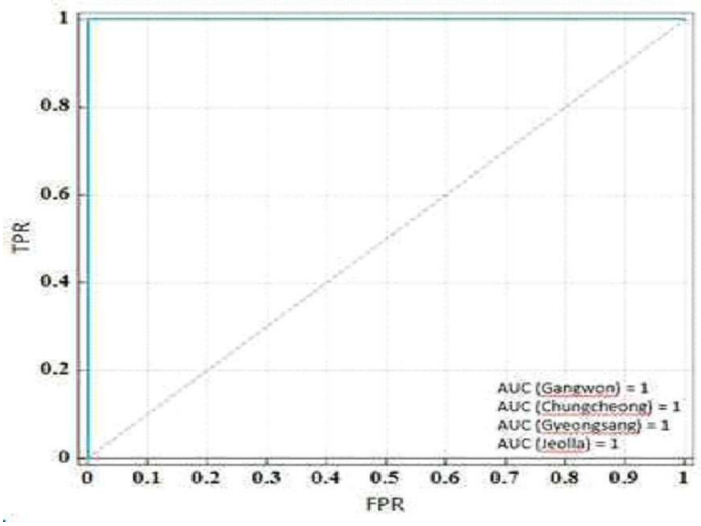
도면2


R2X : 0.781
R2Y : 0.908
Q2 : 0.680
강원도
충청도
경상도
전라도
T1
T2

도면3

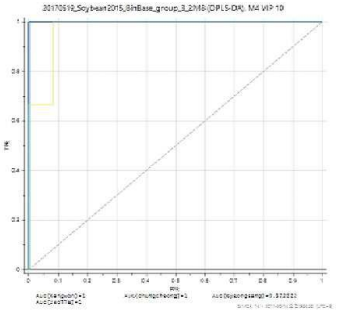

Tryptophan
hreonic acid
Cysteine
Glycerol-alpha-phosphate
phenylalanine
강원도 충청도 경상도 전라도 Mean±SE Mean±1.96*SE

도면4



도면5

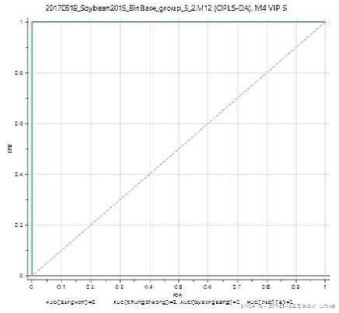
(a) OPLS-DA_ VIP 10 _ ROC



VIP 10
tryptophan
threonic acid
cysteine
glycerol-alpha-phosphate
phenylalanine
nicotinic acid
aspartate
proline
lysine
pyrophosphate

AUC (Gangwon) = 1
AUC (Chungcheong) = 1
AUC (Gyeongsang) = 0.972
AUC (Jeolla) = 1

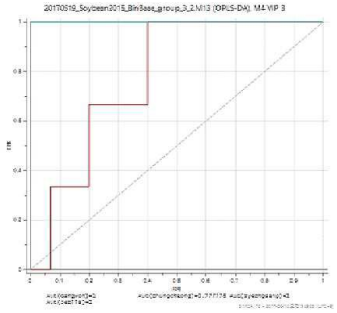
(b) OPLS-DA_ VIP 5 _ ROC



VIP 5
tryptophan
threonic acid
cysteine
glycerol-alpha-phosphate
phenylalanine

AUC (Gangwon) = 1
AUC (Chungcheong) = 1
AUC (Gyeongsang) = 1
AUC (Jeolla) = 1

(c) OPLS-DA_ VIP 3 _ ROC



VIP 5
tryptophan
threonic acid
cysteine

AUC (Gangwon) = 1
AUC (Chungcheong) = 0.778
AUC (Gyeongsang) = 1
AUC (Jeolla) = 1