creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사학위논문

식물 대사체학을 이용한 쌀의 원산지 판별법 연구

Discrimination of rice origins via plant metabolomics study

2016년 2월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

이 정 희

식물 대사체학을 이용한 쌀의 원산지 판별법 연구

Discrimination of rice origins via plant metabolomics study

지도교수 권 성 원

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2015년 11월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

이 정 희

이정희의 석사학위논문을 인준함

2015년 12월

위 원 장	박 정 일	(인)
부 위 원 장	송 준 명	(인)
위 원	권 성 원	(인)

국 문 초 록

쌀 관세화 정책으로 인해 쌀에 대한 수출입 진입장벽이 낮아져 수입산 쌀이 무분별하게 유통되고 있다. 특히 중국산 쌀의 경우, 국내산 쌀과 비교하여 가격은 저렴한 반면, 형태가 유사하여 육안으로 식별하기 어려운 점이 존재한다. 이 점을 악용하여 중국산 쌀을 혼입하거나 원산지를 속여 판매하는 사례가 급증하면서 국내 쌀 산업에 혼란을 초래하고 있다. 이에 중국산 수입산 쌀에 대한 원산지 판별을 위해 식물 대사체학 기반의 분석기술이 필요한 실정이다.

식물 대사체학은 NMR, GC-MS, LC-MS 등의 분석기기를 이용한 식물 내 대사체 정성 및 정량 분석을 통해 식물 내 대사체적 차이를 연구하는 학문이다. 이는 같은 종(genus)의 식물이어도 산지, 기원 등의 조건에 따른 대사체적 차이를 빠르게 규명해낼 수 있는 장점을 지니고 있다.

본 연구에서는 쌀(*Oryza sativa* L.) 내 화학적 주요 성분이 1차 대사체인 점을 감안하여 식물 대사체학 기반 NMR, GC-MS, LC-QToF-MS 기기분석 및 PLS-DA 다변량 통계분석을 통한 한국산 및 중국산 쌀의 원산지 판별을 수행하였다.

쌀은 총 16종(한국산 8종, 중국산 8종)을 수집하여 분쇄 및 동결건조 후 균일하게 분말화하였다. NMR, GC-MS, LC-QToF-MS 각 기기마다 적합한 방법으로 시료를 전처리하였고, 기기분석을 진행하였다.

확보한 스펙트럼 및 크로마토그램 데이터를 통계분석 가능한 형태로 가공하였다. 다음 데이터를 이용하여 PLS-DA 다변량분석 및 T-test를 수행하였고, 한국산 및 중국산 쌀 시료를 유의성있게 판별할 수 있는 대사체 마커 후보군을 선정하였다.

후보군 중 VIP score 1 이상 및 P-value 0.05 이하의 조건을 모두 만족하는 마커를 추려내었다. 추려낸 마커들을 대상으로 표준품 크로마토그램 혹은 HMDB, NIST library, XCMS 등과 같은 데이터베이스에서 제공하는 물질 크로마토그램과 대조하여 물질을 동정하였다.

그 결과, 유의성 있게 집단간 차이를 나타내는 대사체 마커로 최종적으

로 5개를 선정하였다. NMR로는 β-glucose, Glutamine 두 종류의 물질을, GC-MS로는 Malic acid 한 종류의 물질을, LC-QToF-MS로는 LysoPC(16:0), LysoPC(18:0) 두 종류의 물질을 선정하였다.

본 연구를 통해 국내산 및 수입산 쌀의 원산지 판별에 관한 식물 대사체학 분석법을 확립하였고, 차후 바이오마커 발굴과 관련한 원산지 판별법 연구에 있어 초석이 되는 연구로 활용될 것으로 기대된다.

주 요 어 : 식물 대사체학, 쌀, 원산지 판별, 기기분석, 통계분석

학 번 : 2014-21051

목 차

국문초록 · i

목차 · iii

그림목차 · v

도표목차 · vi

I. 서론 (Introduction) · 1

1. 연구배경 (Background) · 1

2. 쌀 (*Oryza sativa* L.) · 1

3. 식물 대사체학 (Plant metabolomics) · · · · · · · · · · · · · · · 2

II. 실험 (Experiment) · 3

1. 시료 준비 (Sampling) · 3

1-1. 시료 수집 (Collection) · 3

1-2. 샘플링 (Sampling) · 4

1-3. 시약, 기구, 장비 (Tool) · 4

2. 데이터 수집 (Data acquisition) · · · · · · · · · · · · · · · · · 4

2-1. 기기분석 (Instrumental analysis) · 4

2-2. 시료 준비 및 분석조건 (Sample preparation & Analytical condition) · · · · · · 5

2-3. 시약, 기구, 장비 (Tool) · 11

3. 데이터 처리 (Data processing) · 13
3-1. Peak 테이블 추출 (Export peak table) · 13
3-2. 과정순서 (Protocol) · 13

4. 대사체 마커 탐색 (Find metabolite markers) · · · · · · · · · · · · · · · 16
4-1. 통계분석 (Statistical analysis) · 16
4-2. PLS-DA (Partial least squares discriminant analysis) · · · · · · · · · · · · · · 17
4-3. T-test · 17

III. 결과 및 고찰 (Result & Discussion) · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 18

1. 기기분석 (Instrumental analysis) · 18

2. 통계분석 (Statistical analysis) · 18
2-1. PLS-DA · 18
2-2. T-test · 19

3. 대사체 정성 (Metabolite identification) · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 20

4. 대사체 마커 확보(Find metabolite markers) · · · · · · · · · · · · · · · · 20

5. 결과 해석 (Discussion) · 21

IV. 결론 (Conclusion) · 23

V. 참고문헌 (References) · 24

Abstract · 26

그 림 목 차

그림 1. 쌀 산업 안전대책 모식도 · 2

그림 2. 식물 대사체학 연구 과정 모식도 · · · · · · · · · · · · · · · · 2

그림 3. 시료 수집 지역 · 3

그림 4. 대사체 마커 정성을 위해 이용된 통계분석 · · · · · · · · · 16

그림 5. 기기분석을 통한 대사체 스펙트럼 · · · · · · · · · · · · · · 18

그림 6. 기기별 PLS-DA 결과 · 19

그림 7. 대사체 후보 선별과정 요약 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 19

그림 8. 대사체 정성과정 예시 · 20

도 표 목 차

도표 1. 분석기기별 특징 요약 · 5

도표 2. 시료 준비과정 및 분석조건 (NMR) · · · · · · · · · · · · · · 5

도표 3. 시료 준비과정 및 분석조건 (GC-MS) · · · · · · · · · · · · 7

도표 4. 시료 준비과정 및 분석조건 (LC-QToF-MS) · · · · · · · · · 9

도표 5. 데이터 처리과정 모식도 (NMR, MS) · · · · · · · · · · · · · 13

도표 6. 쌀의 판별 대사체 마커 후보 · · · · · · · · · · · · · · · · · 21

도표 7. 쌀의 원산지 기준 판별 대사체 마커 함량 비교 · · · · · · 22

I. 서론 (Introduction)

1. 연구배경 (Background)

국내에서 쌀 관세화 정책이 2015년 1월 1일자로 본격적으로 시행됨에 따라 해외 수입산 쌀을 자유롭게 구매할 수 있게 되었다. 특히 중국은 우리나라와 교역거리가 짧고, 우리나라에서 소비되는 쌀과 기원 및 형태 모두 동일하다는 특징을 갖추고 있다.

이에 따라 중국산 쌀의 유입이 폭발적으로 급증하였으며, 국내산 쌀 대비 현저히 낮은 단가로 가격경쟁력을 갖추어 국내 농업시장을 위협하고 있다. 뿐만 아니라 이를 악용하여 소비자에게 쌀의 원산지를 속여 판매하는 업체들의 범법행위가 증가하여 유통체계에 혼란을 일으키고 있다.

위 문제를 바로잡기 위해 정부는 쌀의 부정유통을 방지하기 위해 노력하겠다고 공고하였다. **(그림 1)** 하지만 실질적으로 중국 수입산 쌀과 국내산 쌀을 판별해낼 수 있는 과학적인 방법이 아직 확립되어 있지 않은 실정이다.

이를 해결하기 위한 노력의 일환으로, 본 연구를 통해 식물 대사체학을 이용하여 중국산 및 국내산 쌀의 차이나는 대사체적 판별마커의 확보 및 원산지 판별 활동을 수행하였다.

2. 쌀 (*Oryza sativa* L.)

쌀은 오랜 역사동안 인류의 주식(主食)으로 활용되고 있고, 현재 전세계 인구의 40%가 주식으로 한다. 쌀의 90% 이상은 아시아에서 생산되고 있으며, 소비 또한 아시아를 주축으로 이루어지고 있다.

형태학적으로는 대표적으로 인디카 형태(*Indica* type) 및 자포니카 형태(*Japonica* type) 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 두 형태를 상대적인 기준으로 간주하여 비교하였을 때 인디카 형태는 장립종으로, 길이가 길고 폭이 좁으며 찰기가 적은 특징을 보인다. 반면 자포니카 형태는 중단립종으로, 길이가 짧고 폭이 넓으며 찰기가 많은 특징을 보인다.

지리적으로 인디카 형태는 인도, 베트남 등과 같이 상대적으로 온난한 기후에서 재배되며, 자포니카 형태는 한국, 중국, 일본 등과 같이 비교적 선선한 기후에서 재배되는 경향이 있다.

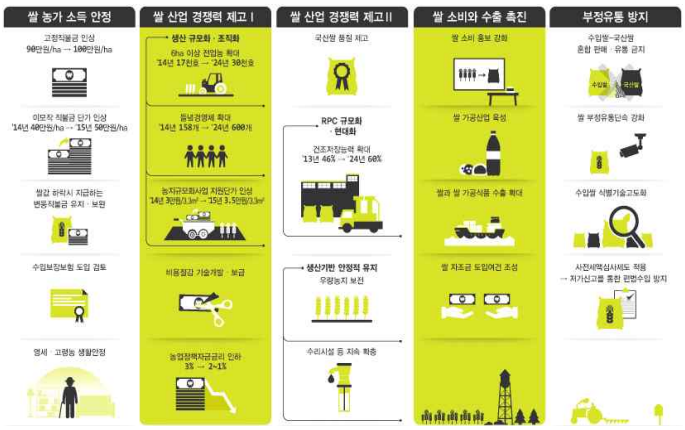
영양학적 측면에서 쌀이 식용 가능한 형태로 가공된 백미(白米)의 경우 탄수화물, 단백질, 지방 등 주로 1차 대사산물로 구성되어있으며, 그 중 탄수화물이 가장 큰 비율을 차지한다.

3. 식물 대사체학 (Plant metabolomics)

식물 대사체학은 분석기기를 이용하여 식물 내 대사체를 분석하고 식물 간 대사체의 정성적 및 정량적 차이를 발견해내는 학문이다. (**그림** 2)

대사체는 당, 단백질 등 물질에 비해 적은 분자량을 지니기 때문에 정성분석 및 정량분석을 빠르고 쉽게 수행할 수 있는 장점을 갖는다.

또한, 분석시 기후, 토양 등과 같은 환경적 요인의 차이에 따라 변화된 물질을 찾아낼 수 있다. 이는 기원이 같은 식물간 차이나는 대사체를 탐색하고 판별마커를 발굴할 수 있는 측면에서 비교적 최근에 들어서야 효과적으로 응용되고 있다.



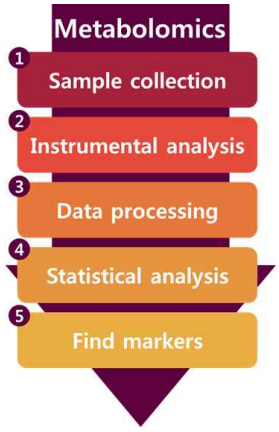


그림 1. 쌀 산업 안전대책 모식도 (농림축산식품부, 2014) (좌)

그림 2. 식물 대사체학 연구 과정 모식도 (우)

II. 실험 (Experiment)

1. 시료 준비 (Sampling)

1-1. 시료 수집 (Collection)

실질적으로 유통되는 형태 및 수출입 통관(通關)이 가능한 형태 모두를 고려하여 백미로 시료를 설정하였다. 또한, 환경적 요인 차이의 최소화를 위해 각국마다 특정지역을 선정하여 시료를 수집하였다. **(그림 3)**

한국산 쌀의 경우, 마켓을 직접 방문하여 가장 많은 상품으로 유통되는 지역인 경기도산 쌀을 선택하여 백미 8종을 구매하였고, 'KR'로 표기하였다. (KR1～KR8)

중국산 쌀의 경우,「중국의 쌀 생산 및 유통구조 조사」(한국농촌경제연구원 정책연구보고, 2009) 보고서를 통해 중국이 정책적 계획을 통해 동북 3성(흑룡강성, 길림성, 요녕성)에서 자포니카 형태의 쌀을 집중적으로 재배한다는 사실을 확인하였다. 이에 기반하여 흑룡강성에서 재배된 중국산 백미 8종을 현지에서 직접 확보하였고, 'CN'으로 표기하였다. (CN1～CN8)

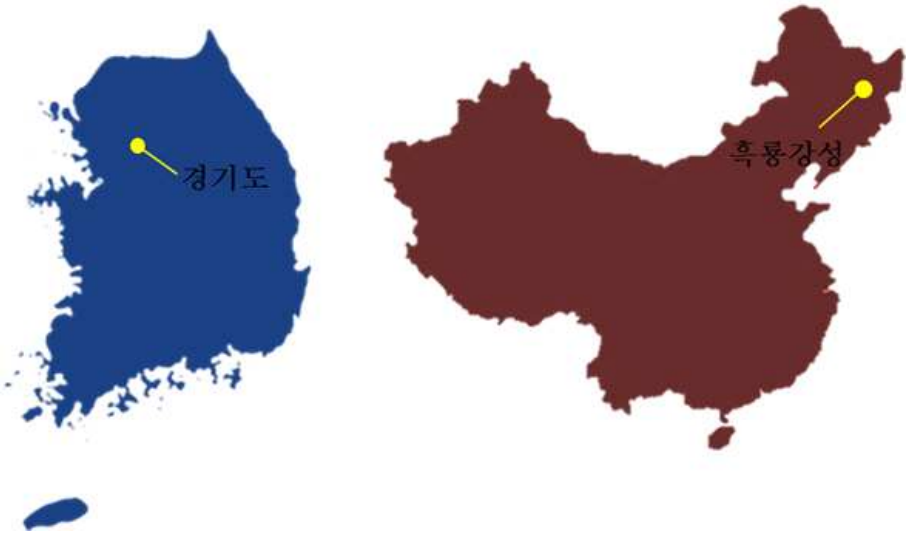


그림 3. 시료 수집 지역 (좌-대한민국, 우-중국)

1-2. 샘플링 (Sampling)

산화, 변패 등 화학적 반응으로 인한 성분의 변화를 최소화하기 위해 시료를 수집하고 난 즉시 50 mL conical tube에 일정량씩 소분하여 -80°C ultra-low temperature freezer에 보관하였다.

균일한 시료의 확보 및 추출효율의 향상을 위해 믹서기를 이용해 간 뒤 체를 쳐서 180 um 이하의 분말형태로 만들어 15 mL conical tube에 담았다. 시료를 바꿀 때마다 Water 및 Methanol로 기구를 세척하였다.

그 후 화학적 변성을 유발하고 분석에 방해할 가능성이 높은 수분을 제거하기 위해 동결건조기를 이용하여 48시간 동결건조를 수행하였다.

1-3. 시약, 기구, 장비 (Tool)

- Water (J.T. Baker, USA)
- Methanol (J.T. Baker, USA)
- Conical tube (15 mL, 50 mL) (SPL Life Sciences, Korea)
- Mixer (PN, Korea)
- Sieve (less than 180 um) (Chung-gye Sanggongsa, Korea)
- -80°C ultra-low temperature freezer (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Freeze-dryer (Operon, Korea)

2. 데이터 수집 (Data acquisition)

2-1. 기기분석 (Instrumental analysis)

최대한 많은 대사체적 판별마커를 확보하기 위한 목적으로 각 기기마다 특징적인 장점을 고려하여 NMR, GC-MS, LC-MS 세 가지 분석기기를 사용하였다. **(도표 1)**

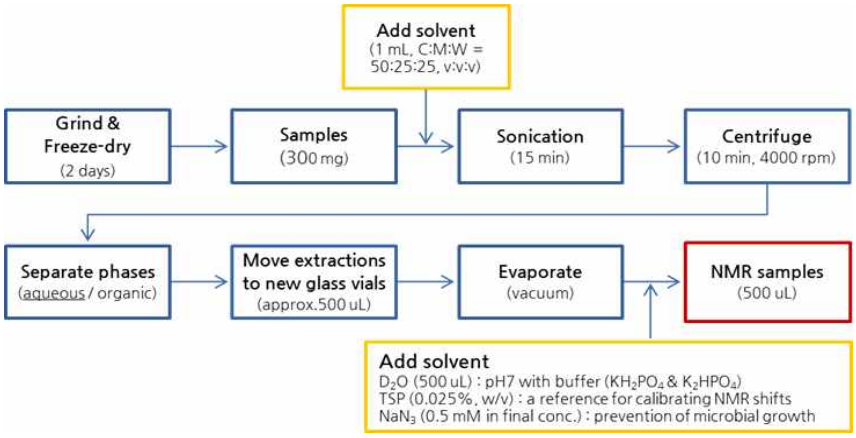
분석기기	장 점	단 점	재현성	선택성
NMR	▪ 시료의 준비 과정이 간편함 ▪ 재현성이 뛰어남 ▪ 물질의 화학적 구조동정에 좋음 ▪ 데이터베이스가 체계적으로 구축되어 있음 (HMDB, BMRB)	▪ 선택성이 낮음 ▪ 분획되지 않은 식물 추출물 분석시 스펙트럼이 복잡함	높음	낮음
GC-MS	▪ 저분자량 1차 대사체 분석에 유리함 ▪ 열에 안정한 물질을 재현성 높게 분석해냄 ▪ 데이터베이스가 체계적으로 구축되어 있음 (NIST library)	▪ 휘발성 물질에 국한됨 ▪ 열에 불안정한 물질은 분석 대상에서 제외됨 ▪ 비휘발성 물질, 극성물질 분석시 유도체화 과정이 필수적임 (실험과정 복잡성) ▪ 2차 대사체 분석은 부적합함		
LC-MS	▪ 열 안정성에 국한하지 않고 물질을 분석할 수 있음 ▪ 극성의 제한으로부터 자유로움 ▪ 선택성이 뛰어남 ▪ 2차 대사체 분석에 유리함	▪ 재현성이 낮음 (Fragment pattern 차이) ▪ 이온화과정으로 문제를 겪음 ▪ 이성질체를 구별할 수 없음	낮음	높음

도표 1. 분석기기별 특징 요약

2-2. 시료 준비 및 분석조건 (Sample preparation & Analytical condition)

NMR, GC-MS, LC-QToF-MS 각 기기분석에 적합하게 시료를 준비하고, 분석조건을 설정하였다. 시료 준비 모식도에서 파란 사각형은 일반적인 흐름을 보여주고, 노란 사각형은 추가적으로 가한 용매 혹은 시약을 표시한 것이다. 초록 사각형은 해당 기기분석에 특이적으로 요구되었던 추가적인 과정을 의미하고, 빨간 사각형은 최종으로 완성된 분석시료를 뜻한다. (**도표 2, 3, 4**)

① NMR



Instrument	Bruker Avance III HD 800 MHz spectrometer (Bruker, USA)
Mode	^{1}H NMR

도표 2. 시료 준비과정 및 분석조건 (NMR)

■ 시료 준비

시료를 300 mg씩 칭량하여 4 mL glass vial에 담은 뒤, 전(全)대사체를 추출하기 위한 목적으로 Chloroform, Methanol 및 Water가 각각 50:25:25(v:v:v) 비율이 되도록 Chloroform을 500 uL 넣고, Methanol 및 Water가 혼합된 용매를 500 uL 가하였다. 극성차이로 인해 용매의 층이 분리되기 때문에 충분히 Vortexing해준 뒤 상온에서 15분간 Sonication을 진행하였다. 그 후 10분간 4000 rpm으로 원심분리를 하였다.

상부(上部)에 위치한 극성 추출물을 약 500 uL 정도 조심스럽게 얻어내어 새로운 Glass vial에 옮겨 담았다. 이 때 얻어낸 상징액은 분자량이 작은 극성 물질을 포함하고 있는 것으로 해석하였다. 극성용매는 상온에서 증발이 어려우므로, 수욕상태에서 Evaporator를 이용하여 진공상태로 용매를 증발시켰다. 그 후, 사전에 pH7로 조정해놓은 중수소로 치환된 Deuterium oxide(D_2O) NMR 용매를 500 uL 가하여 녹인 뒤 NMR tube에 옮겨 담았다.

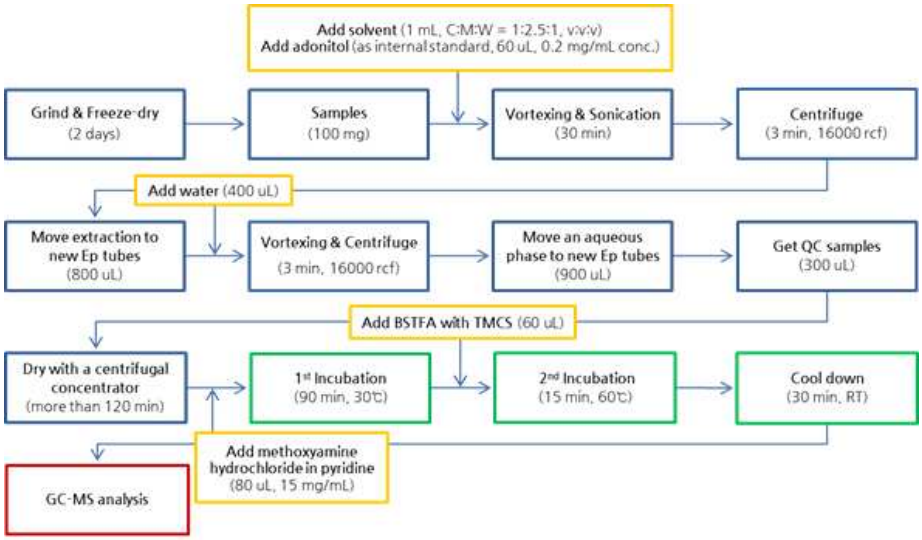
이 때 Deuterium oxide의 pH는 Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)와 Potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4)를 이용하여 조정하였다. NMR 데이터의 ppm의 불필요한 흔들림을 보정하기 위해 TSP를 용액 최종부피의 0.025%(w/v)만큼 가하였다. 또한, 미생물의 번식 방지를 위해 Sodium azide이 최종 농도에서 0.05 mM이 되도록 소량 첨가하였다.

쌀의 경우 비극성 용매로부터 얻어낼 수 있는 비극성 물질보다 극성 용매로부터 확보할 수 있는 극성물질이 월등히 많다고 보고되어 있었다. 때문에 작은 분자량을 지닌 극성 대사체 물질만 선택적으로 취하여 분석을 진행하였다.

■ 분석조건

많은 대사체를 정성해내기 위해 Peak의 높은 분리도(High resolution)를 보여주는 800 MHz NMR spectrometer 기기를 이용하였다. 그리고 분석목적이 새로운 화학물질의 구조 동정이 아닌, 물질의 빠른 Screening을 통한 대사체 후보군 확보였기 때문에 Proton 모드로 분석하였다.

② GC-MS



Instrument	GC	GCMS-2010 Gas chromatograph (Shimadzu, Japan)
	MS	GCMS-QP2010 Gas chromatograph mass spectrometer (Shimadzu, Japan)
Column	DB-5MS (0.25 mm × 30.0 m, 0.25 um)	(Agilent, USA)
GC parameters	Injection temperature	300℃
	Column oven temperature	60℃
	Gradient condition	60℃ → 300℃ (6℃/min) → 300℃ (hold 10 min)
	Flow rate	Helium gas (1.0 mL/min)
MS parameters	Ion source temperature	200℃
	Interface temperature	300℃
	Ionization mode	EI (70eV)
	Acquisition mode	Scan
	Mass range	40 m/z – 500 m/z

도표 3. 시료 준비과정 및 분석조건 (GC-MS)

■ 시료준비

시료를 100 mg씩 칭량하여 2 mL Ep tube에 담은 뒤 쌀 내 전(全)대사체를 추출하기 위한 목적으로 사전에 준비해놓은 Chloroform, Methanol, Water 혼합용매(C:M:W = 1:2.5:1, v:v:v)를 1 mL 가하였다. 그리고 기기분석시 불필요하게 머무름 시간(Retention time)이 흔들려 분석결과에 혼란을 초래하는 요소를 보정하기 위해 Internal standard를 60 uL씩 가했다.

이 때 Internal standard(I.S.)는 쌀에 미포함된 성분인 Adonitol로 선택하여 최종 0.2 mg/mL이 되게끔 위와 동일한 용매인 Chloroform, Methanol, Water 혼합용매(C:M:W = 1:2.5:1, v:v:v)에 용해시켰다. Vortexing 해준 뒤 30분간 Sonication을 해주어 전(全)대사체를 추출하였다.

추출용액만 선택적으로 취하기 위해 3분간 16000 rcf 원심분리를 짧게 시켜준 뒤 상징액만 800 uL 취하여 새 Ep tube에 옮겼다. 그 다음 극성물질만 선택적으로 얻어내기 위한 절차로, 위 상징액에 400 uL의 Water를 가하였다. Water를 더해주는 순간 용액이 불투명한 흰색으로 변하는 것을 확인한 후 위와 동일하게 Vortexing 및 Sonication을 진행하였다. 분리된 층에서 극성인 부분(윗부분)만 선택적으로 취하여 새 Ep tube에 900 uL 옮겨 담았다.

900 uL 중 300 uL씩은 각 추출액으로부터 별도로 취하여 하나의 50 mL conical tube에 모아 Homogenization 시킨 뒤 600 uL씩 새 Ep tube에 나누어 담았다. 혼합된 용액은 GC-MS 기기분석시 기기적인 문제가 발생하지 않고 진행되었음을 증명하기 위해 시료분석 중간마다 일정하게 추가한 Quality control(QC)시료로 활용하였다.

남은 600 uL의 시료 및 Homogenization 시켜준 600 uL 시료의 용매를 우선적으로 제거하기 위해 시료가 담긴 Ep tube를 SpeedVac에 넣고 상온에서 120분 이상 충분한 시간을 갖고 돌려주었다.

추출용매가 극성이었기 때문에 분석에 방해되지 않게 수분을 완전히 제거하기 위해서 유도체화 과정이 필수적이었다. 유도체화는

Methoximation 및 Trimethylsilylation 두 가지 과정으로 구성되었다. Methoximation은 후의 Trimethylsilylation 수행시 Carbonyl기를 지닌 물질을 사전에 보호하기 위한 목적으로 이루어졌다. Trimethysilylation은 대사체 물질의 휘발성 증가 및 열의 안정성 확보를 위해 진행되었다..

Pyridine에 15 mg/mL 로 용해된 Methoxyamine hydrochloride를 각 시료에 80 uL씩 가하여 30°C에서 90분간 1차 Incubation시켜주었다. 그 다음 BSTFA가 첨가된 TMCS를 60 uL씩 추가로 가해주어 Pipetting 해준 뒤 60°C에서 120분간 2차 Incubation을 수행했다.

참고로 유도체화된 시료는 가급적 빠르게, 늦어도 24시간 이내에 진행되어야 유의한 분석결과를 얻을 수 있기 때문에 분석시간을 고려하여 유도체화를 진행할 시료수를 선정하였다.

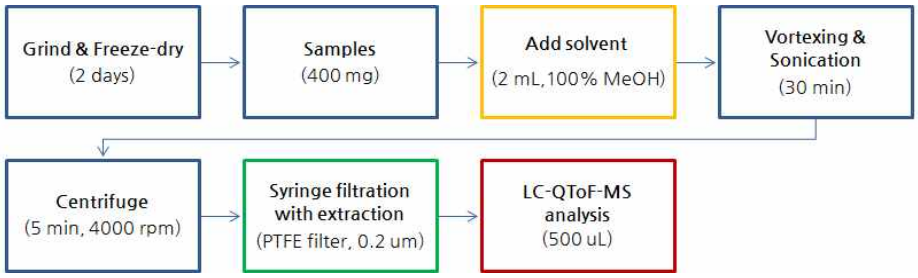
Incubation를 마무리하고 상온에서 30분간 식혀준 뒤 140 uL씩 취하여 Insert를 장착한 GC vial에 담았다.

■ 분석조건

비교적 극성인 대사체를 분석하는 것이었기 때문에 분석 가능한 극성의 범위를 넓게 보유하고 있는 DB-5MS 칼럼을 사용하였다. 물질이 휘발되어야만 분석이 가능하기 때문에 시료가 주입되는 도입부에서 300°C 고온을 설정하였다.

특정 대사체를 사전에 선택하여 분석하는 것이 아닌, 쌀 추출물에 포함된 모든 대사체의 전반적인 Screening을 통한 정성이 목적이었다. 때문에 GC에서 60°C~300°C Gradient 온도조건을 설정하였고 MS는 Scan모드로 지정하여 40 m/z~500 m/z의 넓은 검출범위로 분석했다.

③ LC-QToF-MS



Instrument	LC	Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent, USA)						
	Q-ToF-MS	Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS system (Agilent, USA)						
Column	Waters Acquity UPLC C_{18}	(Waters, USA)						
LC parameters	Flow rate	0.17 mL/min						
	Gradient condition	Time (min)	0	5	15	25	27	45
		Water + 0.1% F.A.	100	70	30	20	0	0
		Acetonitrile + 0.1% F.A.	0	30	70	80	100	100
MS parameters	Ion source	Gas temperature : 350℃ Gas flow : 10 L/min Nebulizer pressure : 30 psi Sheath gas temperature : 350℃ Sheath gas flow : 12 L/min						
	Scan source	Capillary voltage : 4 kV Fragmentor voltage : 170 V						
	Acquisition mode	ESI positive						
	Mass range	30 m/z – 1500 m/z						

도표 4. 시료 준비과정 및 분석조건 (LC-QToF-MS)

■ 시료준비

시료를 400 mg씩 칭량하여 15 mL conical tube에 담은 뒤 100% Methanol을 2mL 가하고 Vortexing 및 30분간 상온 Sonication을 통해 대사체를 추출하였다. 상온에서 5분간 4000 rpm으로 원심분리를 진행하여 부유물을 가라앉혔다.

맑은 상징액 부분만 Syringe로 취한 뒤 0.2 um PTFE syringe filter에 꽂아 추출용액을 필터하였다. 이는 LC-MS 분석시 다른 물질의 Interference를 제거하여 원하는 물질을 분명하게 동정해내기 위한 목적으로 실험 과정을 추가하였다.

500 uL씩 시료로 준비해두었으며, GC-MS 시료 준비 때와 동일하게 시료 중 일부를 취하여 Homogenization 시켜 QC시료를 확보하였다. 기기분석으로 인해 발생하는 머무름 시간의 흔들림을 확인할 수 있도록 시료에 I.S.로 Caffeine을 첨가하였다.

■ 분석조건

LC-MS분석은 NMR 및 GC-MS분석의 한계를 보완해주는 목적으로 수행되었다. 적은 양의 시료도 빠르게 분석할 수 있도록 UPLC 역상 칼럼을 이용하였다. 분리능을 향상시켜 뚜렷한 Peak을 얻기 위해 Gradient 용액인 Water 및 Acetonitrile에 0.1% Formic acid를 첨가하였다.

빠른 스캔속도로 최대한 많은 성분을 동시에 분석할 수 있는 것이 관건이었기에 Q-ToF-MS를 이용하였다. 더불어 Q-ToF-MS는 QQQ와 달리 Library가 구축되어 있어 전압의 변화에 따른 Peak의 조각이온 패턴(Fragment pattern) 확인이 가능한 장점이 있어 활용하였다. 검출범위는 30 m/z~1500 m/z로 광범위하게 잡았으며, ESI positive 모드로 분석하였다. 원산지 판별마커 후보군을 확보한 뒤 선정된 대사체 물질의 확인은 MS/MS 조건으로 진행하였다.

2-3. 시약, 기구, 장비 (Tool)

① 공통적

- ■ Water (J.T. Baker, USA)
- ■ Methanol (J.T. Baker, USA)
- ■ Acetonitrile (J.T. Baker, USA)
- ■ Chloroform (J.T. Baker, USA)
- ■ Pipette (0.5~10 uL, 20~200 uL, 100~1000 uL) (Eppendorf AG, Germany)
- ■ Pipette tip (0.5~10 uL, 20~200 uL, 100~1000 uL) (Eppendorf AG, Germany)
- ■ Ep tube (2 mL) (Eppendorf, Germany)
- ■ Parafilm (Bemis, USA)
- ■ Vortex mixer (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ■ Ultrasonicator (Branson Ultrasonic, USA)
- ■ Centrifugator (Eppendorf, Germany)
- ■ Electronic scale (Mettler Toledo, Switzerland)

② NMR

- Deuterium oxide (Euriso-top, France)
- Potassium phosphate monobasic (Sigma Aldrich, USA)
- Potassium phosphate dibasic (Sigma Aldrich, USA)
- 3-(Trimethylsilyl)propionic 2,2,3,3-d_4 acid, sodium salt, 98 atom % D (Sigma Aldrich, USA)
- Sodium azide (Sigma Aldrich, USA)
- 4 mL glass vial (Korea)
- NMR tube
- pH meter (Orion, Korea)
- Evaporator (Buchi, Switzerland)
- Bruker Avance III HD 800 MHz spectrometer (Bruker, USA)

② GC-MS

- Adonitol (Sigma Aldrich, USA)
- Methoxyamine hydrochloride (Sigma Aldrich, USA)
- Pyridine (Koryo Pure Chemical, Korea)
- N,O - Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (1% TMCS) (Sigma Aldrich, USA)
- Insert (Agilent, USA)
- GC vial (Agilent, USA)
- GC cap (Agilent, USA)
- GC crimper
- Dry oven (Jeiotech, Korea)
- Speedvac concentrator (Thermo Savant, USA)
- Column (DB-5MS, 0.25 mm × 30.0 m, 0.25 um) (Agilent, USA)
- GCMS-2010 Gas Chromatograph (Shimadzu, Japan)
- GCMS-QP2010 Gas Chromatograph mass spectrometer (Shimadzu, Japan)

③ LC-QToF-MS

- Caffeine (Sigma Aldrich, USA)
- LC vial (Agilent, USA)
- LC cap (Agilent, USA)
- Plastic disposable syringe (Henke Sass Wolf, Germany)
- Syringe filter (PTFE, 0.20 um, 13 mm) (Advantec, Japan)

3. 데이터 처리 (Data processing)

3-1. Peak 테이블 추출 (Export peak table)

기기분석을 통해 얻은 스펙트럼을 응용하여 통계분석을 진행하기 위한 목적으로 스펙트럼의 Peak들을 수치화 시켜주는 과정이 필수적으로 요구되었다. 이 때, 통계분석시 뚜렷한 Grouping pattern을 확보하고 그룹간 판별 유의성을 높이기 위한 노력이 필요했다.

의미 있는 Peak들의 중요성을 높이기 위해 그들을 최대한 부각시키는 방법을 진행하였다. Background noise 등과 같은 실질적으로 의미가 없는 Peak들과 구별시키거나 혹은 그들을 선별하여 제거하는 방법을 선택하였다.

3-2. 과정순서 (Protocol)

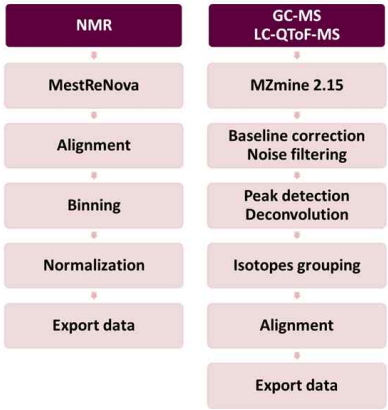


도표 5. 데이터 처리과정 모식도 (NMR, MS)

① NMR

■ 소프트웨어 : MestReNova

■ 데이터 처리 과정

Raw data를 불러온 후 NMR 스펙트럼의 기준이 되는 TSP peak을 0 ppm으로 맞춰주었다. 전체선택을 하여 하나의 NMR 스펙트럼으로 겹쳤다. (Superimpose selected spectra)

그 후 Alignment를 통해 다시 한 번 스펙트럼들을 정렬해주고, Binning을 통해 Peak들을 0.04 ppm 단위당 하나의 Peak 데이터로 만들었다. 이는 지나치게 많은 Peak 데이터로 인한 통계분석의 모호성을 줄여주기 위해 필요한 과정이었다.

그 다음 Normalization 과정을 통해 전체 Peak 면적(Total peak area)을 100으로 기준하여 스펙트럼을 간단하게 만들어주었다. 마지막으로 ASCII file로 데이터를 추출하고, Excel에서 불러와 csv 확장자 파일로 저장하였다.

② MS

■ 소프트웨어 : MZmine 2.15

■ 데이터 처리 과정

Raw data를 불러온 후 스펙트럼에서 Background noise까지 Peak으로 인식되어 불필요한 변수가 증가하지 않게 하기 위해 Mass detection을 수행해주었다. 사전에 MS 스펙트럼 데이터를 확인하여 Intensity 정도를 확인하고, Mass detection 기준을 Centroid, 3×10^5 로 설정하여 Intensity가 3×10^5 이상인 것만 데이터로 인식하도록 하였다.

Chromatogram builder를 통해 한 번 더 스펙트럼 내에서 Peak으로 인식되는 기준을 설정해주었다. 최소시간간격(Minimum time span)은 m/z 스펙트럼의 최소 지속시간을 의미하는 것으로 0.03분으로 설정해주었다. 최소높이(Minimum height)는 1.5×10^4 로 지정해주었고, m/z tolerance의 경우 같은 스펙트럼이라고 인식하는 m/z 범위를 의미하는 것으로, GC-MS 데이터는 0.5, LC-MS 데이터는 0.1 로 설정하였다.

Chromatogram deconvolution은 다른 화합물들이 같은 m/z 값을 보유하고 있을 때, 같게 인식되는 Peak들을 각각 분리해주는 과정으로 해석하였다. Savitzky-golay filter 모델을 적용하였으며, 최소높이(Minimum height)는 1.5×10^4 로 지정해주었고, Peak의 지속범위(Duration range)는 GC-MS 데이터는 0.03분~1분, LC-MS 데이터는 0.01분~1분으로 설정하였다. Derivative threshold level은 사전의 과정을 통해 생성된 Peak intensity의 최소 비율을 의미하는 것으로, 80%로 해주었다.

Isotopic peak grouper의 경우 같은 화합물에서 나타난 동위원소 Peak(Isotopic peak)을 인식하여 하나의 변수로 통합해주는 기능이었다. m/z tolerance는 Chromatogram builder 때 설정해줬던 것과 같게 해주었다. Retention time tolerance는 동위원소 Peak 간 머무름시간 차이의 최대 범위를 의미하는 것으로, 0.05분으로 하였다. Maximum charge란 통합할 동위원소 Peak의 전하차이의 최대 범위로, 대사체학에서는 2 이상은 거의 없기 때문에 보편적으로 이용되는 1로 설정하였다. Representative isotope는 most intense로 설정해주었다.

Alignment는 모델링을 반복 시행하여 Alignment를 진행하는 RANSEC aligner를 이용하였다. m/z tolerance는 위에서 진행했던 과정 내 있던 값과 동일하게 지정하였으며, Retention time tolerance 값은 1분, Retention time tolerance after correction 값은 Retention time tolerance 보다 적은 값인 0.5분으로 지정하였다. Iteration은 Alignment 반복횟수를 의미하는 것으로, 많을수록 성공적인 결과를 보이지만 컴퓨터의 사양 및 성능을 고려하여 50000번으로 조절하였다. Minimum number of point는 각 시료의 데이터간 동일한 Peak의 Linear curve를 그리는 데 사용되는, 점으로 표시되는 데이터 수로, 0.2%로 지정하였다. Threshold level은 4로 선정하여 진행하였다.

Gap filling은 해당 유사한 m/z를 갖는 데이터 중 공백이 있는 부분을 찾아 채워 데이터간 간격을 줄여주는 기능으로, Peak finder에서 Intensity tolerance 는 50%로, m/z tolerance 및 Retention time tolerance는 각각 0.1 로 설정하였다. Filler의 경우 Same m/z and RT

range gap filler를 사용하였다.

차후 공백으로 남겨진 m/z는 통계처리에 방해가 될 수 있기 때문에 처리된 m/z list를 다시 한 번 확인하여 빨간 동그라미로 표현되는 m/z가 채워지지 않은 데이터들을 선택하여 지워주었다.

최종 데이터로부터 m/z, 머무름시간, Peak 높이를 선택하여 csv 확장자 파일로 추출하였다.

4. 대사체 마커 탐색 (Find metabolite markers)

대사체 마커 정성을 목적으로 하단의 그림과 같이 PLS-DA 및 T-test를 수행하였다. (그림 4)

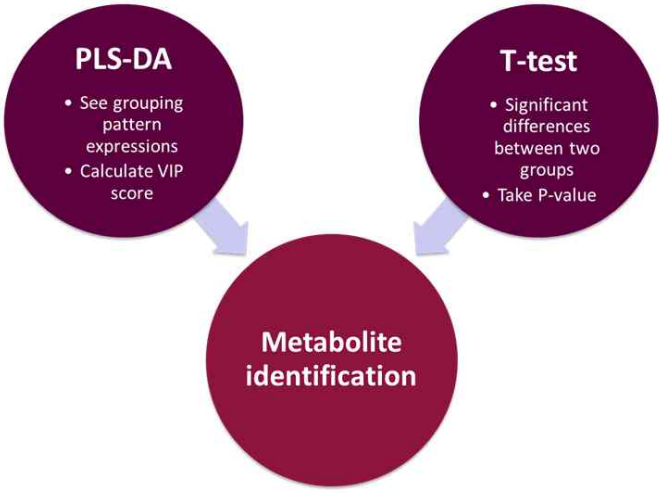


그림 4. 대사체 마커 정성을 위해 이용된 통계분석

4-1. 통계분석 (Statistical analysis)

판별 대사체 마커의 정성(Identification)을 목적으로 기기분석을 통해 얻은 스펙트럼을 수치화한 Peak table을 이용하여 통계분석을 진행하였다. 변수가 많기 때문에 다변량 통계분석(Multivariate statistical analysis)을 수행하였으며, 보편적으로 이용되는 Metaboanalyst 프로그램을 이용하였다.

Metaboanalyst에서 파라미터 설정시, 하나의 그룹 내 한 가지 시료의 전후 데이터를 비교하는 것이 아닌, 여러 그룹의 여러 가지 시료 데이터를 비교하는 것이기 때문에 Unpaired로 지정해주었다. 또한 그룹간 차이를 보다 분명하게 보기 위해서 Log transformation을 Auto scale(Mean-centered) 로 설정하여 각 데이터간 편차를 줄이려 하였다.

통계분석을 통해 VIP score 및 p-value를 확보하였고, VIP score 1.0 이상 및 p-value 0.05 미만 조건을 동시에 충족하는 물질 후보군을 추려 내었다.

4-2. PLS-DA (Partial least squares discriminant analysis)

PLS-DA는 두 집단간의 평균이 통계적으로 유의한 차이를 보이는지 알기 위해 수행된 대표적인 다변량 통계분석 방법 중 하나였다. 최적화된 모델링을 구축하여, 구축된 모델에 미지시료를 적용하였을 때 모델이 제대로 예측 및 판단할 수 있는지 확인하기 위한 목적으로 활용되었다.

PLS-DA 통계분석시 관건은, 실험군을 최대한 분리시켜야 한다는 점과 최적의 실험군 분리를 보여준 모델로부터 유의적인 분리를 나타내주는 대사체가 무엇인지 파악해 내는 것이었다.

이를 위해 VIP score를 획득해냈다. VIP score는 두 그룹간 차이를 명확하게 보여주는 변수가 무엇인지, 통계모델에서 실험군을 분리해내는데 기여한 정도에 따라 높은 값으로 표현되었다. 그 중 VIP score 1 이상의 값을 지닌 후보군만 유의성을 지닌다고 판단하였다.

결국 VIP score 확보를 위해 PLS-DA 다변량 통계 분석을 시행하였다.

4-3. T-test

T-test는 독립적인 두 그룹간 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이는지 확인하기 위해 수행된 통계 방법이었다. 이 때, 두 그룹간 차이를 보이는 결과가 정말 유의한지 측정하는 지표인 p-value 의 확인이 필수적이었다. P-value 0.05 미만의 값을 지닌 후보군만 유의하다고 판단하였다. 궁극적으로 P-value 확보를 위해 T-test 분석을 수행하였다.

III. 결과 및 고찰 (Result & Discussion)

1. 기기분석 (Instrumental analysis)

NMR, GC-MS, LC-QToF-MS 분석기기를 이용하여 다음과 같은 스펙트럼을 확보하였다. (그림 5)

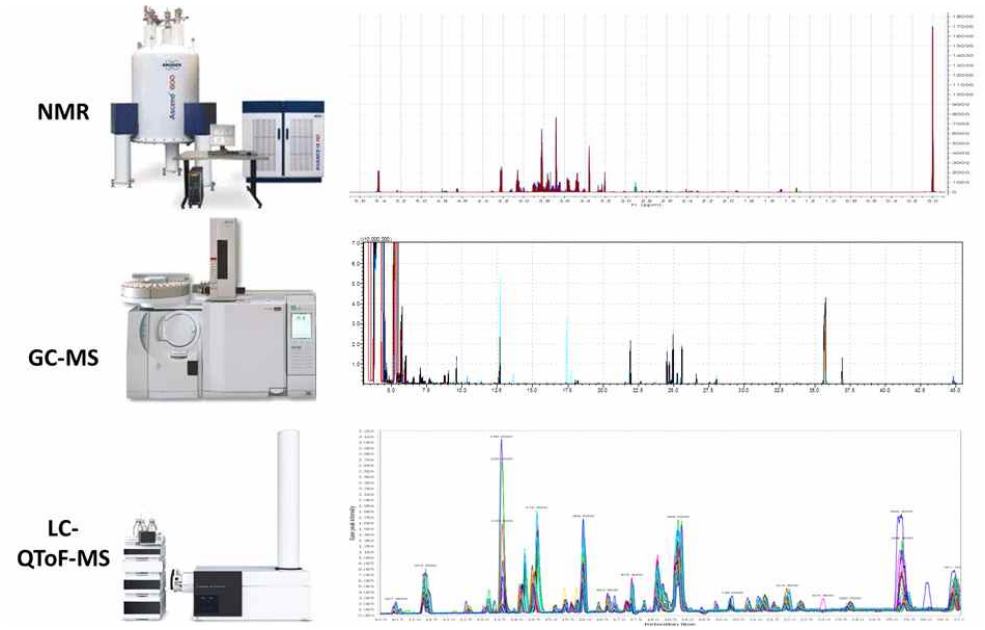


그림 5. 기기분석을 통한 대사체 스펙트럼

2. 통계분석 (Statistical analysis)

2-1. PLS-DA

기기별 Peak 데이터를 Metaboanalyst에서 PLS-DA 통계분석으로 그룹 패턴을 확인하고 VIP score 값을 확보하였다. 그 중 VIP score 1 이상의 후보군만 선정하였다. (그림 6, 7)

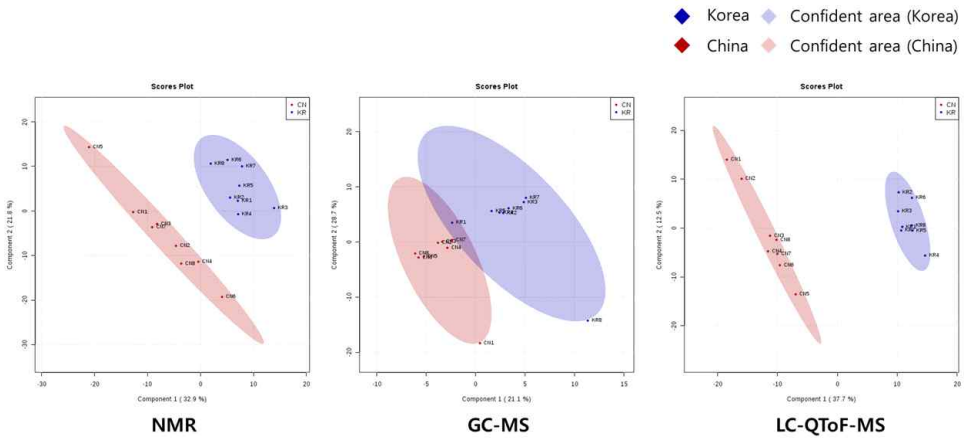
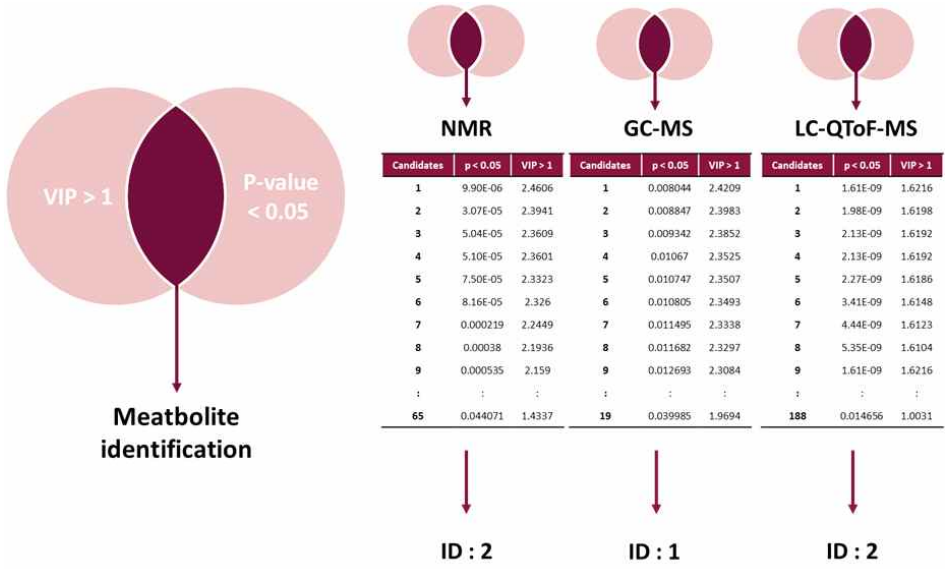


그림 6. 기기별 PLS-DA 결과

2-2. T-test

T-test를 수행하여 그룹간의 차이가 유의함을 증명하는 0.05 미만의 p-value값을 지닌 후보군을 확보하였다. 그 후 VIP score 1 이상을 지닌 후보군과 대조하여 두 조건을 모두 만족하는 최종 후보군을 다음과 같이 얻어내었다. (그림 7)



Candidates	p < 0.05	VIP > 1
1	9.90E-06	2.4606
2	3.07E-05	2.3941
3	5.04E-05	2.3609
4	5.10E-05	2.3601
5	7.50E-05	2.3323
6	8.16E-05	2.326
7	0.000219	2.2449
8	0.00038	2.1936
9	0.000535	2.159
:	:	:
65	0.044071	1.4337

Candidates	p < 0.05	VIP > 1
1	0.008044	2.4209
2	0.008847	2.3983
3	0.009342	2.3852
4	0.01067	2.3525
5	0.010747	2.3507
6	0.010805	2.3493
7	0.011495	2.3338
8	0.011682	2.3297
9	0.012693	2.3084
:	:	:
19	0.039985	1.9694

Candidates	p < 0.05	VIP > 1
1	1.61E-09	1.6216
2	1.98E-09	1.6198
3	2.13E-09	1.6192
4	2.13E-09	1.6192
5	2.27E-09	1.6186
6	3.41E-09	1.6148
7	4.44E-09	1.6123
8	5.35E-09	1.6104
9	1.61E-09	1.6216
:	:	:
188	0.014656	1.0031

그림 7. 대사체 후보 선별과정 요약

3. 대사체 정성 (Metabolite identification)

위 통계분석을 통해 확보한 대사체 후보군을 다음과 같은 과정으로 정성(Identification)하였다. NMR 스펙트럼의 경우 Standard 및 HMDB 표준품 라이브러리와 대조하였고, GC-MS 스펙트럼의 경우 NIST 라이브러리에서 제공되는 표준품 스펙트럼과 대조하였다. LC-MS 스펙트럼의 경우 정성시엔 MS/MS 조건으로 확인한 스펙트럼을 XCMS 라이브러리 표준 스펙트럼과 대조하였다. **(그림 8)**

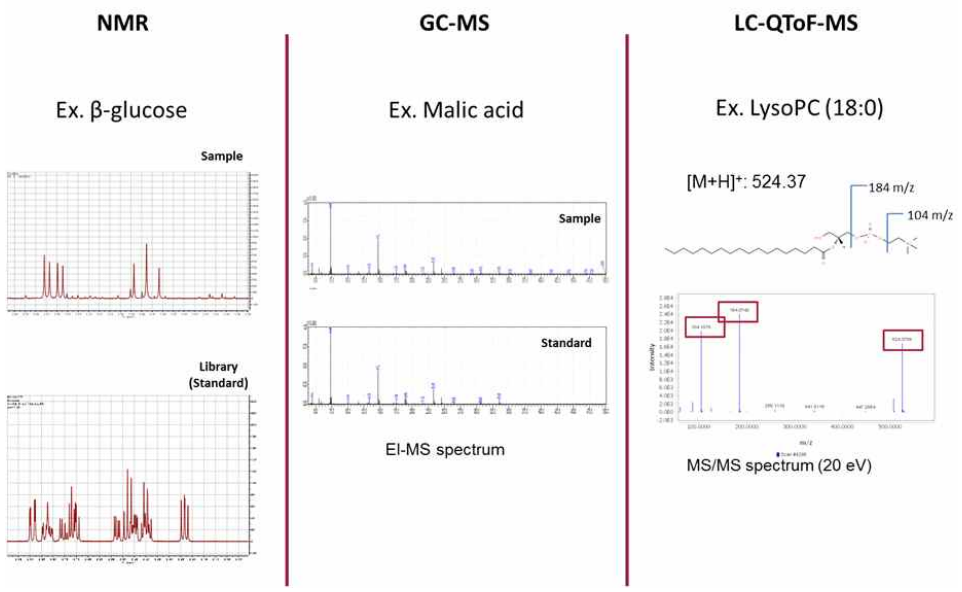


그림 8. 대사체 정성과정 예시

4. 대사체 마커 확보 (Find metabolite markers)

다음과 같이 다섯 개의 판별 대사체 마커 후보군을 확보하였다. NMR로는 β-glucose와 Glutamine, GC-MS로는 Malic acid, LC-QToF-MS로는 LysoPC(16:0), LysoPC(18:0)를 찾아내었다. **(도표 6)** 또한 함량을 비교하였을 때, 판별 마커후보로 지정된 다섯 가지 대사체 모두 중국산 쌀에서 함량이 더 높게 나타났음을 확인할 수 있었다. **(그림 9)**

Analytical platforms	Potential markers	Molecular formula	Molecular weight	P-value	VIP score	Fold change (CN/KR)
NMR	Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.145	9.90E-06	2.4606	8.9348
	β-glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	0.00038	2.1936	2.3417
GC-MS	Malic acid	$C_4H_6O_5$	134.087	0.008044	2.4209	1.8056
LC-QToF-MS	LysoPC(16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	495.630	1.98E-09	1.6198	1.8188
	LysoPC(18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	523.683	1.81E-06	1.5156	2.0332

도표 6. 쌀의 판별 대사체 마커 후보

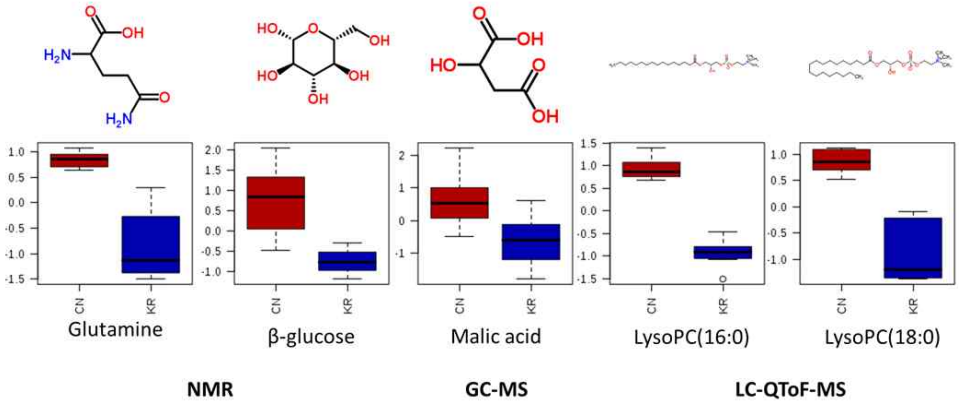


그림 9. 쌀의 원산지 기준 판별 대사체 마커 함량 비교

5. 결과 해석 (Discussion)

이처럼 판별마커로 선정된 대사체의 함량이 모두 중국산 쌀에서 더 높게 나타난 원인은 기후 및 온도의 영향이 큰 요인으로 작용했을 것으로 판단된다.

우선 쌀 시료의 원산지를 보았을 때, 중국산 쌀은 우리나라 쌀보다 더욱 높은 위도에서 재배되었다. 이는 곧 중국산 쌀이 보다 추운 지역에서 생장하였다는 뜻으로 해석할 수 있다. 실제 자포니카 형태 쌀을 대상으

로 추운 환경에서 자랄수록 Phospholipids의 함량이 많다는 연구가 보고되었다.

또한, Glutamine 및 Malic acid는 따뜻한 기후에서 생장한 인디카 형태의 쌀보다 보다 추운 기후에서 생장한 자포니카 형태에 비교적 높은 함량을 보인다고 알려져 있다. 이처럼 쌀을 크게 두 가지 그룹으로 나눌 수 있는 데 기후환경과 밀접한 관련이 있다.

기존의 연구 및 이번 연구 모두를 고려하였을 때, 위 양상은 환경적인 스트레스에 대해 식물이 효소 및 분해반응을 줄임으로써 자신을 보호하려는 하나의 방어기전 현상으로 생각해 볼 수 있다. (**도표 7**)

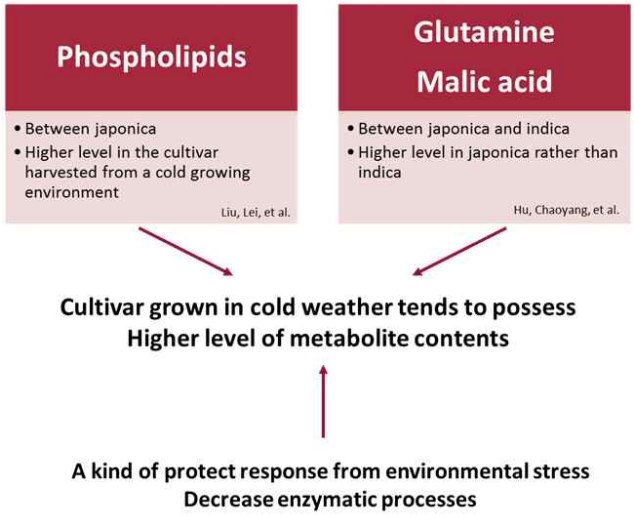


도표 7. 쌀 내 대사체 함량 차이 및 기후환경의 연관성

IV. 결론 (Conclusion)

1. 식물 대사체학을 응용하여 쌀의 원산지 판별을 위한 식물 대사체 마커를 발굴하는 실험모델을 확립하였다. (대한민국 n=8, 중국 n=8)

2. 세 가지 분석기기를 이용한 분석 수행 결과, 총 5개의 유의성 있는 대사체를 발굴하였다. (VIP score > 1, P-value < 0.05)
   NMR : Glutamine, β-glucose
   GC-MS : Malic acid
   LC-QToF-MS : LysoPC(16:0), LysoPC(18:0)

3. 쌀 내 대사체 함량에 대한 차이는 원산지의 기후 차이와 밀접한 연관을 보이는 것으로 판단된다.

4. 본 연구를 통해 선정된 쌀 원산지 판별 대사체 마커들은 향후 국내 쌀 산업 유통체계의 혼란을 막는데 도움을 줄 수 있는 바이오마커 개발의 초석이 될 것으로 사료된다.

V. 참고문헌 (References)

1. Kusano, Miyako, et al. "Using metabolomic approaches to explore chemical diversity in rice." *Molecular plant* 8.1 (2015): 58-67.
2. Ernst, Madeleine, et al. "Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing." Natural product reports 31.6 (2014): 784-806.
3. Yi, Lunzhao, et al. "Recent advances in chemometric methods for plant metabolomics: A review." Biotechnology Advances, doi 10 (2014): 1016.
4. Park, Sangkyu, Young-Su Seo, and Adrian D. Hegeman. "Plant metabolomics for plant chemical responses to belowground community change by climate change." *Journal of Plant Biology* 57.3 (2014): 137-149.
5. Hu, Chaoyang, et al. "Metabolic variation between japonica and indica rice cultivars as revealed by non-targeted metabolomics." *Scientific reports* 4 (2014).
6. Lee, Dong-Kyu, et al. "Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of Schisandra chinensis by GC/MS and LC/MS." *Food chemistry* 141.4 (2013): 3931-3937.
7. Um, Jung A., et al. "Discrimination between genetically identical peony roots from different regions of origin based on 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolomics: determination of the geographical origins and estimation of the mixing proportions of blended samples." *Analytical and bioanalytical chemistry* 405.23 (2013): 7523-7534.
8. Kim, Jae Kwang, et al. "Comparative metabolic profiling of pigmented rice (Oryza sativa L.) cultivars reveals primary

metabolites are correlated with secondary metabolites." *Journal of Cereal Science* 57.1 (2013): 14-20.

9. Liu, Lei, et al. "Phospholipids in rice: significance in grain quality and health benefits: a review." *Food chemistry* 139.1 (2013): 1133-1145.
10. Redestig, Henning, et al. "Exploring molecular backgrounds of quality traits in rice by predictive models based on high-coverage metabolomics." *BMC systems biology* 5.1 (2011): 176.
11. Kim, Hye Kyong, Young Hae Choi, and Robert Verpoorte. "NMR-based metabolomic analysis of plants." *Nature Protocols* 5.3 (2010): 536-549.
12. Fumagalli, E., et al. "NMR techniques coupled with multivariate statistical analysis: tools to analyse Oryza sativa metabolic content under stress conditions." *Journal of Agronomy and Crop Science* 195.2 (2009): 77-88.
13. Wu, Huifeng, et al. "High-throughput tissue extraction protocol for NMR-and MS-based metabolomics." *Analytical biochemistry* 372.2 (2008): 204-212.
14. Lisec, Jan, et al. "Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants." *NATURE PROTOCOLS-ELECTRONIC EDITION-* 1.1 (2006): 387.

Abstract

Discrimination of rice origins via plant metabolomics study

Lee, Jeonghee
Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis
The Graduate School
Seoul National University

As a custom policy on rice changed from 2015, it has become an easy access to purchase imported rice. It continually causes serious problems in domestic rice industry. For example, Chinese rice is similar with Korean rice in the respect of its physical characteristics. And its price is much reasonable rather than Korean. Based on those points, illegal events are rapidly increased through the distribution system. To prevent additional interruption to the distribution system, it has been strongly required to develop analytical technologies on discriminating rice origins based on geographical features.

Plant metabolomics can be one of the effective approach for solving the social issue. It performs both quantitative and qualitative analysis to find out metabolomic differences in plants with hyphenated analytical platforms like NMR, GC-MS, and LC-MS. It figures out

differences on meatabolites based on environmental conditions easily.

In this study, the discrimination of rice origins between Korean and Chinese was performed with instrumental analysis and multi-variate statistical analysis. In terms of major metabolite compounds in rice(*Oryza sativa* L.), primary metabolites were mainly found.

Polished white rice samples were collected in each nation and they became as dry powder. Samples were appropriately prepared for each analytical platforms and were analyzed.

Spectrum were gathered and moderately processed to progress statistical analysis. PLS-DA was done because it provides practical data for deciding significant metabolite marker candidates. Among them, potential markers were selected which could meet specific two conditions simultaneously. (VIP score > 1 and P-value < 0.05)

Those were identified by comparing standard spectrum or chromatograms from database or libraries in common.

As a result, five metabolite markers were finally identified that can clearly show differences between groups. β-glucose, Glutamine were found out through NMR. Malic acid was identified by GC-MS. And for LC-QToF-MS, LysoPC(16:0), LysoPC(18:0) were of markers.

The study set the experimental method on developing discriminative metabolite markers of rice origins via plant metabolomics. And it could be considered as a fundamental research to develop biomarkers for preventing adulteration on rice in the near future.

Keywords : Plant metabolomics, Rice (*Oryza sativa* L.), Discrimination of origins, Instrumental analysis, Statistical analysis

Student number : 2014-21051