pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 4, pp. 466~472 (2012)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

가공식품 중 태국칡(*Pueraria mirifica*) 혼입 판별법 개발

박용춘* · 진상욱 · 김미라 · 김규헌 · 이재황 · 조태용 · 이화정 · 이상재 · 한상배
식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 식품감시과학팀

Detection Method for Identification of *Pueraria mirifica* (Thai kudzu) in Processed Foods

Yong-Chjun Park*, Sang-Wook Jin, Mi-Ra Kim, Kyu-Heon Kim, Jae-Hwang Lee, Tae-Yong Cho, Hwa-Jung Lee, Sang-Jae Lee, and Sang-Bae Han
Scientific Food Investigation Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Food & Drug Administration, 187 Osongsaengmyeong2(i)-ro, Osong-eup, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea
(Received May 3, 2012/Revised July 7, 2012/Accepted December 3, 2012)

ABSTRACT - In this study, ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*), RNApolymeraseC (*rpoC1*), intergenic spacer (*psbA-trn*H), and second internal transcribed spacer (*ITS2*) as identification markers for discrimination of *P. mirifica* in foods were selected. To be primer design, we obtained 719 bp, 520 bp, 348 bp, and 507 bp amplicon using universal primers from selected regions of *P. mirifica.* The regions of *rbcL, rpoC1*, and *psbA-trnH* were not proper for design primers because of high homology about *P. mirifica, P. lobata*, and *B. superba*. But, we had designed 4 pairs of oligonucleotide primers from *ITS2* gene. Predicted amplicon from *P. mirifica* were obtained 137 bp and 216 bp using finally designed primers SFI12-miri-6F/SFI12-miri-7R and SFI12-miri-6F/SFI12-miri-8R, respectively. The species-specific primers distinguished *P. mirifica* from related species were able to apply food materials and processed foods. The developed PCR method would be applicable to food safety management for illegally distributed products in markets and internet shopping malls.

Key words: PCR (Polymerase Chain Reaction), *Pueraria mirifica*, species-specific primer

칡(*Pueraria spp.*)은 콩 과(Family)에 속하는 덩굴성 다년식물로서 *Pueraria* 속(Genus)에 8종이 분포(www.ncbi.nlm.gov/taxonomy)하며 한국, 중국, 극동 러시아, 일본 등을 포함한 극동아시아의 온대영역에 폭넓게 분포한다. 예로부터 칡은 한국, 중국 등에서 중요한 약용식물로 사용되어 왔다. 칡의 효능으로는 해열, 발한 등의 감기약으로 사용하거나 편두통, 편도선염, 주독치료 등에 사용된다[1]. 칡의 성분에 대한 연구로는 칡 뿌리에 플라보노이드가 함유되어 있다고 보고되어 있으며[2], 약리작용에 관한 연구에서는 항바이러스, 항 혈액응고, 급성간염 억제, 혈압강화작용 등의 결과가 보고되어 있다[3,4]. 또한 피토스테롤이라는 물질이 함유되어 있다[5,6]. 피토스테롤은 콜레스테롤 수치를 낮추는 작용으로부터 시작하여, 호르몬 조절작용에 이르기까지 매우 광범위하게 인체에 유익한 작용을 한다.

최근 국내로 수입되는 식품, 건강기능식품, 화장품 원료 중에는 안전성이 확인되지 않은 성분을 혼입하여 그 효능에 대하여 과대 광고한 제품이 유통되어 안전사고 발생의 우려가 증가하고 있다. 일명 '태국칡'이라고 하는 *Pueraria mirifica*는 white kwao krua(또는 Thai kudzu)로 알려져 있으며, 피토에스트로젠을 다량 함유하고 있다[5]. 일부 화장품 생산업자 및 약리기능 원료 공급업자는 식욕증진, 여성가슴확대 등의 효능을 주장하고 있지만 과학적 근거는 확보되지 못하고 있는 실정이며 *P. mirifica*를 이용한 동물실험 결과 허용량 이상 섭취 시 백혈구 감소 및 자궁비대와 같은 부작용이 확인되었다[7,8,9]. 또한 수입된 제품을 섭취한 소비자 중 상당수가 하혈을 하거나 생리가 멎지 않는 부작용을 겪은 사례가 발견되기도 하였다[8]. 이로 인해 국내에서는 식품공전에 '식품에 사용할 수 없는 원료' 목록

*Correspondence to: Yong-Chjun Park, Scientific Food Investigation Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Food & Drug Administration, 187 Osongsaengmyeong2(i)-ro, Osong-eup, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea
Tel: 82-43-719-4454, Fax: 82-43-719-4450
E-mail : yongchjun@korea.kr

으로 규정하고 있으며[10] 시중에 불법으로 유통되는 *P. mirifica*를 사용한 제품에 대한 관리를 위하여 지표성분 확보 및 분석법 확립이 반드시 필요하다.

식물의 종 판별을 위해서는 형태적 분석, 단백질 분석, 동위원소 분석 등이 이용되고 있으며[11,12], 최근에는 분자생물학적 기술을 이용하는 방법으로 DNA 분자수준에서 염기서열 차이에 기초하여 종(species)을 구분하는 방법으로서 restriction fragment polymorphism (RFLP), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), 종 특이 프라이머를 통한 유전자 증폭 등이 널리 사용되고 있다[13]. RFLP, RAPD는 일반적으로 두 생물체가 계통 유전학적으로 얼마나 유사성이 있는가를 판별할 때 주로 이용되며, 프라이머의 염기가 하나만 바뀌어도 밴드 양상이 다르게 나타날 수 있다[13]. 특히 종 특이 프라이머(species specific primer)를 이용한 PCR (Polymerase Chain Reaction) 기법은 극소량의 DNA로 특정 염기서열 영역을 특이적으로 증폭함으로서 신속 정확하고 감수성이 매우 높은 종 판별법으로 알려져 있으며 칡의 분류에 유용하게 사용될 수 있는 기법이라고 알려져 있다[14]. 식물의 경우 종 동정을 위하여 주로 사용하는 부위는 유전학적으로 잘 보존되어 있다고 알려진 엽록체에 존재하는 유전자인 ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*), maturase (*matK*), intergenic spacer (*psbA-trnH*), RNA polymerase C (*rpoC1*), RNA polymerase beta subunit (*rpoB*), NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit J (*ndhJ*), acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase β-subunit (*accD*)과 핵에 위치한 internal transcribed spacer (*ITS, ITS1, ITS2*) 등이 있다[15,16,17,18]. 또한 최근 약용식물을 대상으로 연구한 결과 핵 염색체에 위치한 second internal transcribed spacer (*ITS2*) 부위가 PCR을 통한 증폭률이 높아 유용하게 사용될 수 있다고 보고되었다[19].

본 연구는 일반 프라이머를 사용하여 종 동정을 위한 유전자부위를 증폭하고 염기서열을 결정하였으며, 유전자은행에 등록되어있는 염기서열과의 비교분석을 통하여 종 특이 프라이머를 설계하고 PCR 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

재료선정

태국 칡인 *P. mirifica*에 대하여 태국 칡의 일종인 *Butea superba* 및 국내에 주로 자생하는 칡(*P. lobata*, wild type)을 대조군으로 선정하였다. 그리고 *Pueraria spp*. 또는 *P. mirifica*가 함유되어있다고 표시되어있는 제품 3종을 대상으로 하였다.

시약 및 검체 구입

유전자증폭(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 위한 프라이머 및 *Taq* DNA polymerase는 바이오니아(Bioneer, 대한민국)에 의뢰하여 합성 또는 구매하였으며, 유전자증폭 산물에 대한 염기서열결정은 식품의약품안전평가원 (미생물과)에 의뢰하여 수행하였으며, PCR 장비는 GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)을 사용하였다. 검체로부터 유전자 추출은 DNeasy Plant mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하였다. 표준시료인 *P. mirifica* 및 *B. superba*는 식품의약품안전평가원 (첨단분석팀)으로부터, 국내에서 자생하는 칡(*P. lobata*, wild type)은 국립생물자원관 (야생생물유전자원센터)에서 분양받았다. 그리고 *Pueraria spp*. 또는 *P. mirifica*가 함유되어 있다고 표시되어있는 제품 3종은 경인지방식품의약품안전청 (위해사범조사T/F팀)으로부터 제공받았다.

유전자 추출

DNeasy Plant mini kit를 사용하여 유전자를 추출하였다. 추출방법은 제조사에서 제공하는 추출법에 의거하여 추출하였으며, 단 최종 용출단계에서는 AE 완충용액 대신 멸균증류수를 사용하여 DNeasy Mini spin column으로부터 용출하였다

일반 프라이머를 위한 PCR 반응액 조성 및 반응조건

PCR을 위한 반응액의 조성은 주형 DNA 50 ng, dNTPs 200 μM, $MgCl_2$ 2.5 mM, 프라이머 각 0.5 μM이 되게 혼합하였으며 최종 부피는 25 μL로 하였다. 그리고 프라이머별로 PCR의 재결합 온도 및 시간을 변경하면서 증폭이 가장 잘 일어나는 조건을 선정하였다. 종 동정을 위하여 second internal transcribed spacer (*ITS2*), RNA polymerase C (*rpoC1*), intergenic spacer (*psbA-trnH*) 및 ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*)의 유전자를 선정하였으며 각각 일반 프라이머(universal primer)인 S2F/S3R, 2 forward/4 reverse, fwd PA/rev TH 및 1F/724R 등 4종류의 프라이머를[19] 사용하였다(Table 1). 최적의 반응조건은 Table 2에 명시하였다.

종 특이 프라이머를 위한 PCR 반응액 조성 및 반응조건

PCR을 위한 반응액의 조성은 상기에 명시된 조건과 동일하며 *P. mirifica* 판별을 위한 종 특이 프라이머를 위한 PCR 반응조건은 95°C에서 5분 예비가열 후, 95°C 30초 변성, 65°C 30초 재결합, 72°C 30초 중합반응 등의 과정을 30회 반복하고 마지막에 72°C에서 5분간 처리하였다.

염기서열 분석

PCR 증폭산물에 대한 염기서열을 결정하였으며 그 결과에 대한 비교 및 분석은 BioEdit ver. 7.0.9.0을 이용하였다.

PCR 산물의 확인

최종산물의 확인은 반응액 3 μl를 취하여 아가로즈 젤로

Table 1. Information of universal primer used in this study

Target region	Primer	Primer Sequence (5' → 3')	Length (bp)	Ref.
ITS2[1)]	S2F S3R	ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT	163~311	Chen, et al 2010
rpoC1[2)]	2 forward 4 reverse	GGC AAA GAG GGA AGA TTT CG CCA TAA GCA TAT CTT GAG TTG G	462~556	
psbA/trnH[3)]	fwd PA rev TH	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	103~1,025	
rbcL[4)]	1F 724R	ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC	702~883	

[1)] second internal transcribed spacer, [2)] RNA polymerase C, [3)] intergenic spacer, [4)] ribulose bisphosphate carboxylase

Table 2. Information of PCR condition used in this study

Primer	Step	Temp.	Time	Cycles
S2F/S3R	Initial denaturation	95°C	5 min	
	Denaturation	94°C	1 min	40
	Annealing	56°C	30 sec	
	Extention	72°C	45 sec	
	Elongation	72°C	10 min	
2 forward/4 reverse	Initial denaturation	94°C	4 min	
	Denaturation	94°C	30 sec	40
	Annealing	53°C	40 sec	
	Extention	72°C	40 sec	
	Elongation	72°C	7 min	
fwd PA/rev TH	Initial denaturation	94°C	5 min	
	Denaturation	94°C	1 min	30
	Annealing	55°C	1 min	
	Extention	72°C	1.5 min	
	Elongation	72°C	7 min	
1F/724R	Initial denaturation	95°C	2 min	
	Denaturation	94°C	1 min	34
	Annealing	55°C	30 sec	
	Extention	72°C	1 min	
	Elongation	72°C	7 min	

100V, 30분간 전기영동하고 EtBr로 염색(1 μg/ml)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인하였다.

결 과

일반 프라이머를 이용한 PCR 및 염기서열 결정

*P. mirifica*의 종 특이 프라이머를 개발하기 위하여 칡에 대한 염기서열 정보가 필요하다. 이를 위하여 일반 프라이머를 이용하여 second internal transcribed spacer (*ITS2*), RNA polymerase C (*rpoC1*), intergenic spacer (*psbA-trnH*)

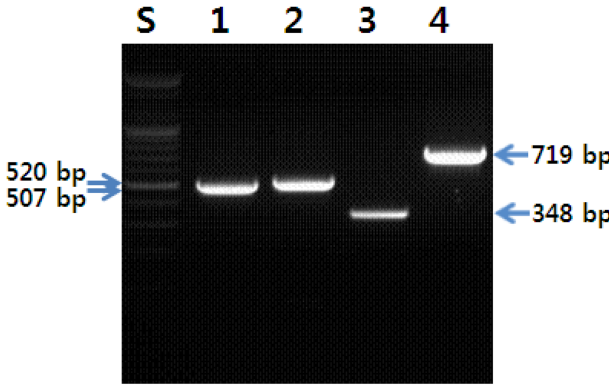

Fig. 1. PCR product patterns of *P. mirifica* by PCR using universal primers. Lane 1 ; S2F/S3R for *ITS2*, 2 ; 2 forward/4 reverse for *rpoC1*, 3 ; fwd PA/rev TH for *psbA/trnH*, 4 ; 1F/724R for *rbcL*.

및 ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*) 유전자를 대상으로 PCR을 실시하였다. PCR 결과 각 부위에 대하여 507 bp, 520 bp, 348 bp 및 719 bp의 증폭산물이 생성됨을 확인 하였다(Fig. 1). 그리고 PCR 산물에 대하여는 염기서열을 결정하였으며 미국 국립보건원(NIH)에서 운영하는 유전자은행에 각각 등록하였다(*ITS2* : GenBank accession No. JQ886463, *rpoC1* : GenBank accession No. JQ886464).

P. mirifica 판별을 위한 종 특이 프라이머 개발

종 특이 프라이머를 개발하기 위하여 *P. mirifica*의 ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*) 유전자부위에 대한 염기서열 결정 후 유전자은행(www.ncbi.nlm.gov)에 등록되어있는 *P. lobata* 및 *P. phaseoloides*와 비교분석하였으나 염기서열에 큰 차이점이 없어 종 특이 프라이머를 설계하기 어려웠다. RNA polymerase C (*rpoC1*) 및 intergenic spacer (*psbA-trnH*)의 경우 등록되어있는 *P. lobata* 및 *P. peduncularis*와 비교하였으나 프라이머를 설계하기에는 한계가 있었다. 그러나 second internal transcribed spacer (*ITS2*)의 경우 *P. lobata* 및 *B. superba*와 비교분석한 결과 염기서열의 다양성이 확인되어 종 특이 프라이머 개발이 가능하였다. 제작한 프라이머는 정방향 2종류 및 역방향 2종류이며(Fig. 2 및 Table 3), 각각을 조합하여(SFI12-miri-

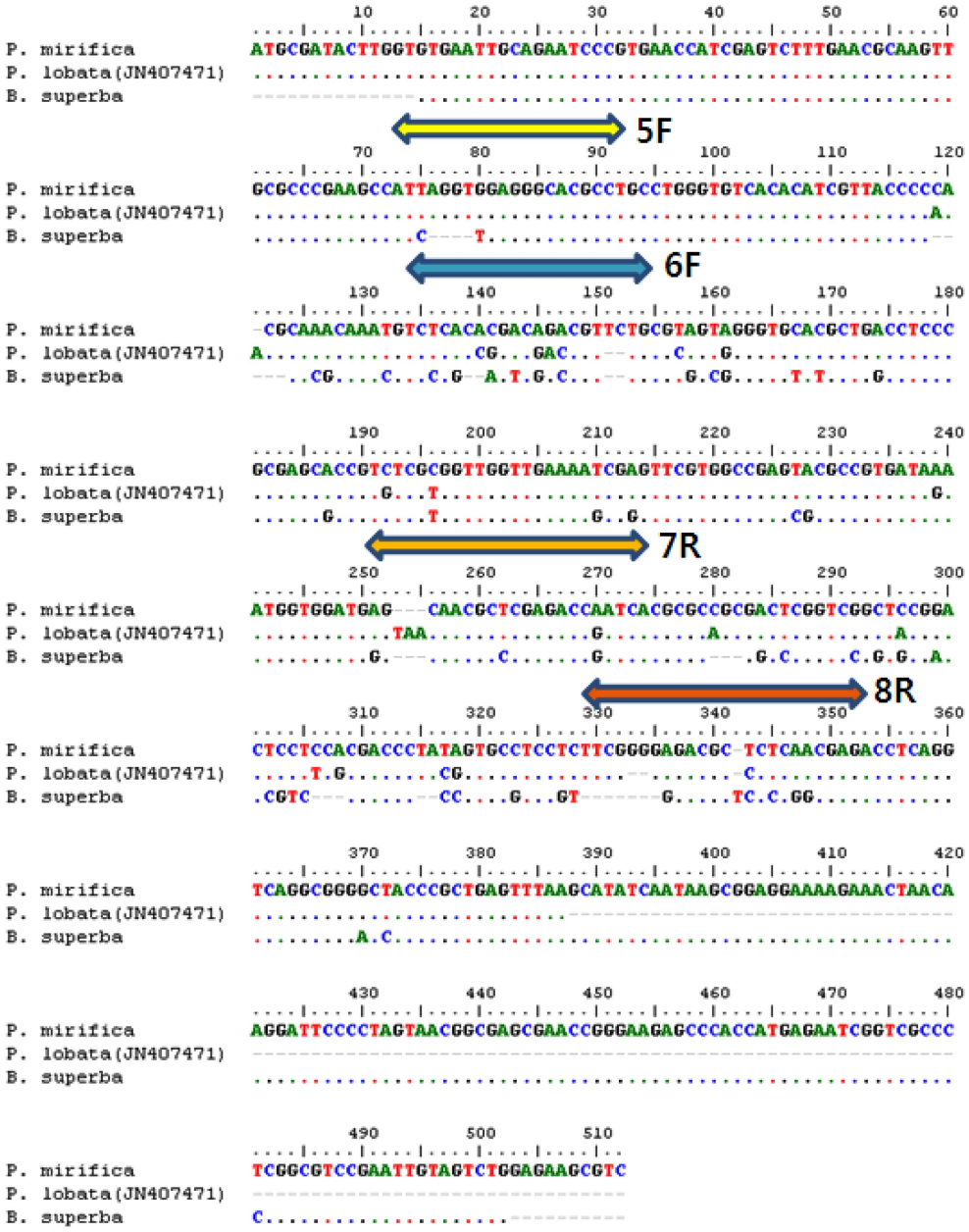

Fig. 2. Nucleotide alignment and primer information designed from ITS2 gene of *P. mirifaca, P. lobata* and *B. superba*. Abbreviation, 5F; SFI12-miri-5F, 6F; SFI12-miri-6F, 7R; SFI12-miri-7R, 8R; SFI12-miri-8R.

Table 3. Information of species-specific primer for detection of *P. mirifaca*

Target region	Primer Name	Primer Sequence (5' → 3')	Length (bp)
second internal transcribed spacer (ITS2)	SFI12-miri-5F	ATTAGGTGGAGGGCACGCCT	5F/7R : 199
	SFI12-miri-6F	TCTCACACGACAGACGTTCTG	5F/8R : 277
	SFI12-miri-7R	TGATTGGTCTCGAGCGTTGCT	6F/7R : 137
	SFI12-miri-8R	TCTCGTTGAGAGCGTCTCCCCGAA	6F/8R : 216

5F/SFI12-miri-7R, SFI12-miri-5F/SFI12-miri-8R, SFI12-miri-6F/SFI12-miri-7R 및 SFI12-miri-6F/SFI12-miri-8R) 총 4종의 프라이머를 설계하였다. 이를 이용하여 *P. mirifica, P. lobata, B. superba*를 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 SFI12-miri-5F/SFI12-miri-7R 및 SFI12-miri-5F/SFI12-miri-8R의 경우 비 특이적 밴드가 약하게 생성되었으나, SFI12-miri-6F/SFI12-miri-7R 및 SFI12-miri-6F/SFI12-miri-8R의 경우에는 *P. lobata* 와 *B. superba*에서 비 특이적 밴

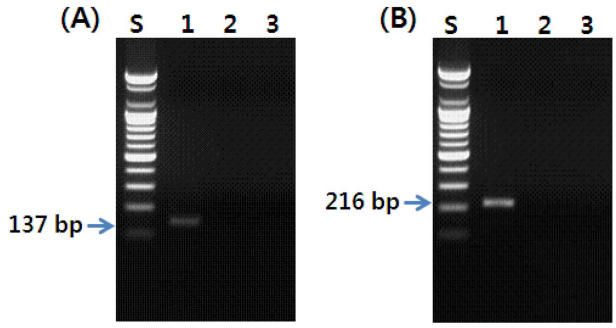

Fig. 3. Detection of *P. mirifica* by PCR using species-specific primer [SFI12-miri-6F/SFI12-miri-7R(A), SFI12-miri-6F/SFI12-miri-8R (B)]. Lane 1; *P. mirifica*, 2; *P. lobata*, 3; *B. superba*.

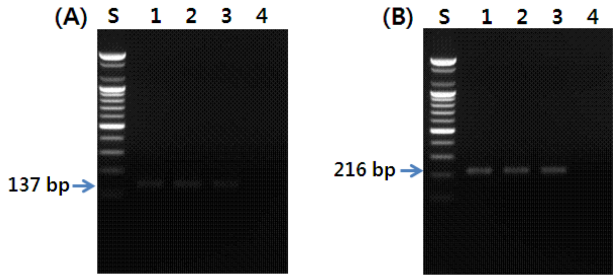

Fig. 4. Detection of *P. mirifica* from processed food by PCR using species-specific primer [SFI12-miri-6F/SFI12-miri-7R(A), SFI12-miri-6F/SFI12-miri-8R (B)]. Lane 1; *P. mirifica,* 2; Gyengin 01 (labeled *P. mirifica* 100%), 3; Gyengin 02 (labeled Thai Pueraria root extract), 4; Gyengin 03 (labeled Pueraria root 100%).

드가 없으며 *P. mirifica*에서 예상 크기인 137 bp 및 216 bp의 특이밴드가 명확하게 확인되었다(Fig. 3).

종 특이 프라이머를 이용한 가공식품의 적용성 검토

대상식품은 총 3종이며 *P. mirifica* 100%, 태국칡뿌리추출분말, Pueraria 뿌리 100% 로 표기되어 있었으며, 본 연구에서 개발된 *P. mirifica* 검출용 종 특이 프라이머 2종을 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 결과 *P. mirifica* 100% 및 태국칡뿌리추출분말로 표기되어있는 제품에서는 SFI12-miri-6F/SFI12-miri-7R 및 SFI12-miri-6F/SFI12-miri-8R 프라이머를 사용한 경우 각각 137 bp 및 216 bp의 PCR 산물이 확인되었다(Fig. 4). 그러나 Pueraria 뿌리 100%로 표기되어있는 제품에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다.

고 찰

본 연구에서는 *P. mirifica*의 종 특이 프라이머를 개발하기 위하여 유전자은행에 등록되어있는 염기서열을 이용하려고 하였으나 등록되어있는 데이터가 없었다. 따라서 식물의 종 동정에 일반적으로 이용되고 있는 유전자부위를 선정하여 염기서열을 결정하고 BioEdit ver. 7.0.9.0 프로그램을 이용하여 Pueraria 등의 칡에 대하여 등록되어있는 염기서열과 비교하여 프라이머를 설계하였다. 대상 유전자는 기 발표된 논문[15]에 기초하여 ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*), RNA polymerase C (*rpoC1*), intergenic spacer (*psbA-trnH*) 및 second internal transcribed spacer (*ITS2*) 유전자부위를 선정하였다. 선정된 유전자부위를 증폭하기 위하여 일반 프라이머를 이용하였으며 각각 719 bp, 520 bp, 348 bp 및 507 bp의 예상되는 PCR 산물을 확인한 후 염기서열을 결정하였으며, 일부 유전자에 대하여 유전자은행에 각각 등록하였다(*ITS2* : GenBank accession No. JQ886463, *rpoC1* : GenBank accession No. JQ9886464). 상기 4종의 유전자에 대한 염기서열과 유전자정보은행(www.ncbi.nlm.gov)에 등록되어있는 유사종과의 분석한 결과 ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*), RNA polymerase C (*rpoC1*), 및 intergenic spacer (*psbA-trnH*)는 염기서열에 대한 유사성이 매우 높아 프라이머를 설계하기 어려웠으나 second internal transcribed spacer (*ITS2*)의 경우 염기서열의 차이점이 있어 프라이머 설계가 가능하여 총 4종류를 설계하였다. 대조군으로 사용된 *P. lobata*의 경우 국내에서 주로 자생하는 칡이며, *B. superba*는 태국칡의 일종으로 *P. mirifica*가 여성을 위한 칡이라면 *B. superba*은 남성을 위한 제품이라고 광고하고 있기 때문에 선정하였으며 또한, *B. superba*의 경우 *P. mirifica*와 속(Genus)은 다르지만 *rpoC1* 등의 유전자 염기서열의 상동성이 매우 높은 것으로 확인 되어 산정하였다. PCR 실시 결과 SFI12-miri-6F/SFI12-miri-7R 및 SFI12-miri-6F/SFI12-miri-8R의 경우 *P. lobata* 와 *B. superba*에서 비 특이적 밴드가 없으며 *P. mirifica*에서 예상크기인 137 bp 및 216 bp를 확인할 수있었다. 그리고 가공식품을 대상으로 적용성을 확인한 결과 2제품에서는 확인이 되었으나 Pueraria root 100%라고 명시되어있는 제품에서는 특이밴드가 불검출되어 *P. mirifica*가 함유된 것처럼 소비자를 혼동하게하는 허위제품이 아닌가 추정된다.

상기와 같이 최근 값싼 식품원료를 대체하여 사용하거나 표시사항을 허위로 기재하여 소비자를 기만하는 가짜식품(EMA, Economically Motivated Adulteration)의 제조 및 유통으로 인하여 식품에 대한 막연한 불안감이 높아지고 있다. 이와 더불어 국내로 수입되는 식품, 화장품 및 그 원료 중에는 안전성이 확인되지 않은 성분을 혼입하고 그 효능을 과대 광고한 제품이 국내에 유통되어 안전사고 발생의 우려가 증가하고 있다. 특히 *P. mirifica*는 안전성이 확인되지 않아 식품공전 별표 3에 '식품에 사용할 수 없는 원료' 목록으로 규정되어 있으나 현재까지 분석법이 마련되어있지 않아 안전관리에 어려움이 있다. 따라서 소비자를 보호하고 식품의 건전한 유통질서 확립과 식품안전관리를 위하여 분석법 마련이 시급하다.

식품원료의 경우 이화학적 분석법, 단백질분석법 등의 적용이 가능하나 가공식품의 경우 식품제조 공정 중 처리

되는 압력, 고열, 식품첨가물 등에 대하여 단백질 보다 안정성이 높은 유전자를 대상으로 하는 유전자분석법의 적용이 효율적이다. 유전자분석법 중 일반 프라이머를 이용한 동물성 원료의 종 판별은 2003년 Herbert 등에 의해 미토콘드리아에 존재하는 cytochrome c oxidase subunit (COI), cytochrome b 등의 부위를 이용하면 신속하고 정확하게 판별할 수 있다고 제안하였으며[20,21] 'DNA barcode' 이라는 용어를 처음으로 사용하였다[17]. 식물성원료의 경우는 ribulose bisphosphate carboxylase (*rbc*L), maturase (*matK*), intergenic spacer (*psbA-trnH*), RNA polymerase C (*rpoC1*), RNA polymerase beta subunit (*rpoB*), NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit J (*ndhJ*), acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase beta subunit (*accD*) 등이[22,23,24,25,26], 곰팡이류에는 internal transcribed space (*ITS*)가 주로 사용되고 있다[27,28]. 최근 약용식물에 대한 연구에는 nuclear ribosomal DNA에 위치한 second internal transcribed spacer (*ITS2*)부위가 PCR을 통한 증폭율이 높아 유용하게 사용될 수 있다는 보고가 있다[19]. 특히 식물류의 경우는 두 가지 이상의 일반 프라이머를 이용 하여 종 판별에 사용되고 있는데 PCR 후에 염기서열을 결정하는 단계가 추가되어 비교적 분석시간이 길고, 데이터베이스에 등록되어 있는 염기서열이 없으면 분석이 어려우며, PCR 산물의 크기가(약 650 bp) 커서 가공식품 적용엔 한계가 있다. 그러나 각 원료별 염기서열 데이터가 확보되어 있다면 종 특이 프라이머가 일반 프라이머의 단점을 해결할 수 있다.

따라서 본 연구에서 개발된 *P. mirifica*을 판별할 수 있는 종 특이 프라이머는 식품원료 및 가공식품에 대한 적용할 수 있어 인터넷 쇼핑몰 등 시중에 불법적으로 유통되는 제품에 대한 안전관리에 활용도가 매우 클 것으로 기대된다.

요 약

식품 중 *P. mirifica* 원료 함유여부에 대한 판별법 마련을 위하여 식물의 종 동정에 일반적으로 사용되는 ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*), RNA polymerase C (*rpoC1*), intergenic spacer (*psbA-trnH*) 및 second internal transcribed spacer (*ITS2*) 유전자부위를 선정하였다. 선정된 유전자부위를 증폭하기 위하여 일반 프라이머를 이용하였으며 각각 719 bp, 520 bp, 348 bp 및 507 bp의 PCR 산물을 확인하였다. 그리고 염기서열을 결정하고 유전자은행에 등록되어있는 염기서열과 유사성에 대한 분석한 결과 *rbcL*, *rpoC1* 및 *psbA-trnH* 부위는 상동성이 매우 높아 프라이머를 설계하기는 어려웠다. 그러나 *ITS2*의 경우 염기서열의 차이점이 있어 4종류의 프라이머를 설계하였다. 설계된 프라이머를 이용하여 *P. mirifica, P. lobata, B. superba*에 대한 PCR을 실시한 결과 SFI12-miri-6F/SFI12-miri-7R 및 SFI12-miri-6F/SFI12-miri-8R의 경우 *P. lobata* 와 *B. superba* 에서 비 특이적 밴드가 없으며 *P. mirifica*에서 예상크기인 137 bp 및 216 bp를 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발된 *P. mirifica*을 판별할 수 있는 종 특이 프라이머는 식품가능원료 및 가공식품에 대한 적용할 수 있어 인터넷 쇼핑몰 등 시중에 불법적으로 유통되는 제품에 대한 안전관리에 활용도가 매우 클 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 식품의약품안전평가원 2012년도 연구개발사업지원비 (12161소비연114)에 의해 수행되었으며, 표준시료를 제공하여주신 국립생물자원관 (야생생물유전자원센터) 및 식품의약품안전평가원 (첨단분석팀), 염기서열결정에 도움을 주신 식품의약품안전평가원 (미생물과)에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim, J.S., Kim, D.K., Jang, D.S., and Kim, J.H.: Genetic variation and phylogenetic relationship of and pueraria lobata ohwi (fabaceae) and related taxa by RPAD markers. *Korean J. Plant Res*, **22**, 446-453 (2009).
2. Koichi, T. and Hideji, I.: Isoflavonoids and the other constituents in callus tissues of pueraria lobata. *Chem. Pharm. Bull,* **30**, 1496-1499 (1982).
3. Junei, K., Juncihi, F., Junko, B., Takashi, T. and Masaki, Y.: Studies on the constituents of pueraria lobata. *Chem. Pharm. Bull,* **35**, 4846-4850 (1987).
4. Takashi, S., Akihiko, K., Akira, T., Yoshio, T. and Tatsuzo, F.: Mechanism of fantioxidants action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoids) and mangiferin (a Zanthonoid). *Chem. Pharm. Bull*, **40**, 721-724 (1992).
5. Chandeying, V. and Lamlertkittikul, S.: Challenges in the conduct of thai herbal scientific study: efficacy and safety of phytoestrogen, pueraria mirifica(kwao keur kao), phase1, in the alleviation of climacteric symptoms in perimenopausal women. *J. Med. Assoc. Thai*, **90**, 1274-1280 (2007).
6. Lee, Y.S., Park, J.S., Co, S.D., Son, J.K., Cherdshewasart, W. and Kang, K.S.: Requirement of Metabolic activation for estrogenic activity of *pueraria mirifica. J. Vet. Sci,* **3**, 273-277 (2002).
7. Virojchaiwong, P., Suvithayasiri, V. and Itharat, A.: Comparison of pueraria mirifica 25 and 50 mg for menopausal symptoms. *Arch. Gynecol. Obstet*, **284**, 411-419 (2011).
8. Jaroenporn, S., Malaivijitnond, S., Wattanasiirmkit, K., Trisomboon, H., Watanabe, G., Taya, K. and Cherdshewasart, W.: Effects of pueraria mirifica, an herb containing phytoestrogens, on reproductive organs and fertility of adult male mice. *Endocr. J,* **30**, 93-101 (2006).
9. Manonai, J., Chittacharoen, A., Theppisai, U. and Theppisai, H.: Effect of pueraria mirifica on vaginal health. *Menopause*,

14, 919-924 (2007).
10. 식품의약품안전청: 식품공전, 별표 3 (2011).
11. Padovan, G.J., Jong, D.D., Rodrigues, L.P. and Marchini, J.S.: Detection of adulteration of commercial honey samples by the 13C/12C isotope ratio. *Food Chem,* **82**, 633-636 (2003).
12. Schellenberg, A., Chmielus, S., Schlicht, C., Camin, F., Perini, M., Bontempo, L., Heinrich, K., Kelly, S.D., Rossmann, A., Thomas, J. and Horacek, M.: Multielement stable isotope ratio(H, C, N, S) of honey from different european regions. *Food Chem,* **121**, 770-777 (2010).
13. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livark, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acids. Res,* **18**, 6531-6535 (1990).
14. Bunmanop, S., Sakuanrungsirikul, S. and Manakasem, Y.: White kwao krua variety classification by botanical characteristics and ISSR-Touchdown PCR technique. *Russ. J. Genet*, **47**, 819-828 (2011).
15. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech*, **3**, 294-299 (1994).
16. Herbert, P.D.N., Retnasingham, S. and deWaard, J.R.: Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B,* **270**, S96-S99 (2003).
17. Hebert, P.D.N. Cywinska, A., Shelley L.B. and deWaard, J.R.: Biological identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B,* **270**, 313-321 (2003).
18. Chen, S. and Song, J.: Validation of the ITS2 region as a Novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, **5**, e8613. dol:10.1371 (2010).
19. Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L. and Zhu, Y.: Validation of the ITS2 region as a Novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS one*. **5**, e8613-8620 (2010).
20. Hsieh, H.M., Chiang, H.L., Tsai, L.C., Lai, S.Y., Huang, N.E., Linacre, A. and Lee, J.C.: Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Sci. Int*, **122**, 7-18 (2001).
21. Wolstenholme, D.R.: Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol*, **141**, 173-216 (1992).
22. Chen, S. and Song, J.: Validation of the ITS2 region as a Novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLos One*, **5**, e8613. dol:10.1371 (2010).
23. Fay, M.F., Bayer, C., Alverson, W.S., deBruijin, A.Y. and Chase, M.W.: Plastid *rbcL* sequence data indicate a close affinity between Diegodendron and Bixa. *Taxon*, **47**, 43-50 (1998).
24. Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesankurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G. and Husband, B.C.: Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PloS ONE*, **3**, e2802 (2008).
25. Newmaster, S.G. and Ragupathy, S.: Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical Acacia (Mimosoidea, Fabaceae). *Mol. Ecol. Res*, **9**, 172-180 (2009).
26. Gray, M.W., Cedergren, R.Y. and Sankoff, A.D.: On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genome. *Proc. Natl. Acad. Sci,* **86**, 2267-2271 (1989).
27. Chung, J.W., Kim, G.Y., Ha, M.G., Lee, T.H. and Lee, J.D.: Phylogenetic analysis of the genus phellinus by comparing the sequences of internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal DNA. *Korean J. Mycol*, **27**, 124-131 (1999).
28. Park, D.S., Go, S.J. and Ryu, J.C.: Phylogenetic relationships of coprinoid taxa and an agaric-like gastrois taxon based on the sequence of internal transcribed spacer (ITS) regions. *Korean J. Mycol*, **27**, 406-411 (1999).