

## Capillary electrophoresis를 이용한 울무의 원산지 판별

류미라\* · 김은영 · 김상숙  
한국식품개발연구원

### Identification of Cultivate Sites for Job's-tears (*Coix lachrymajobi var. mayuen*) using Capillary Electrophoresis

Mee-Ra Rhyu\*, Eun-Young Kim and Sang-Sook Kim  
Korea Food Research Institute

Optimal extraction, separation, and capillary rinsing conditions for capillary electrophoresis (CE) were established to identify the cultivation site (domestic vs. foreign) of Job's-tears (*Coix lachrymajobi var. mayuen*) using 240 samples (domestic sample n = 121, foreign sample n = 119). Job's-tears was extracted with 30% ethanol and separated on a 50- $\mu$ m I.D. untreated fused-silica capillary. Optimal analytic conditions were: temperature, 45°C; voltage, 15 kV; detector rise time, 0.1 sec; and pressure injection, 20 sec. Separation of peak investigated using 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) containing 0.05% hydroxypropylmethylcellulose (P buffer) revealed the optimal separation buffer was P buffer containing 26 mM hexane sulfonic acid with 30% methanol. Under the optimal conditions established for CE, the average correct identification percentage of domestic or foreign Job's-tears was 82%.

**Key words:** analytic condition, capillary electrophoresis, identification of cultivate site, Job's-tears (*Coix lachrymajobi var. mayuen*)

## 서 론

곡류는 전세계 모든 나라에서 중요한 식품으로 에너지의 공급원이 되며 이에 존재하는 단백질은 여러 식품에서 다양한 기능적 성질을 나타낸다<sup>(1)</sup>. 곡류 단백질은 외형적 특성만으로는 파악이 어려운 곡류의 품질이나 품종 판별을 위하여 주로 전기영동, chromatography 등을 이용한 분석에 이용되어져 왔다. 그러나 이러한 분석법은 분석시간이나 비용이 많이 드는 단점이 있다. 최근 기존의 분석방법보다 speed와 분리도가 뛰어나고 분석에 필요한 sample량을 최소화 할 수 있으며 양적 digital 분석이 가능한 새로운 분리법으로 capillary electrophoresis(CE)가 적용되기 시작하고 있다. Capillary electrophoresis는 전기영동과 같이 기본적으로 전기장에서의 differential migration에 따라 분석이 이루어지나 gel이 없는 free solution 상태에서 분석하는 것으로, 결과적으로 전기력에 따라 analyte가 이동(electrophoresis)하면서 concentration-sensitive detector 위치를 지날 때 전기적인 신호가 생겨 이를 검출하는(HPLC) 방법이다<sup>(2)</sup>. 이 방법은 SDS-PAGE나 HPLC로

분리 가능한 물질들에 모두 적용할 수 있으며 최근 여러 방면에서 신속한 분리법으로 개발 응용되고 있다<sup>(3)</sup>. CE를 곡류의 품종판별에 이용한 것은 Bietz and Schmalzried<sup>(4,5)</sup>가 gliadin 분석을 통한 밀의 품종판별을 시도한 것을 시작으로 귀리와 쌀<sup>(6,7)</sup>, 옥수수<sup>(8)</sup>, 보리<sup>(9)</sup> 및 수수<sup>(10)</sup> 등에 적용되어 왔고 우리 나라에서는 본 연구팀에 의해 국내산 쌀의 품종판별<sup>(11)</sup> 및 재배지역에 따른 차이식별<sup>(12)</sup>에 이용된 바 있다.

우리 나라는 최근 농산물의 수입자유화 이후 외국 농산물의 수입이 급증하고 있으며 이 제품들의 가격이 국산보다 저렴하여 의도적으로 산지를 속이는 경우가 많다. 이와 같은 농산물의 불법유통을 방지하기 위해서는 이들 농산물의 산지나 재배 조건에 따라 발생하는 품질의 차이를 효율적으로 구분하는 신속 정확한 원산지 식별법이 개발되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 최근 수입이 급증한 품목 중 하나인 울무를 선택하여 이의 신속한 원산지 판별 가능성 검토를 위해 CE 분석조건 확립 및 이의 적용 가능성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 사용 기기

울무시료는 2000년 국내산 47점, 수입 48점과 2001년 국내산 74점, 수입 71점을 각각 cyclone mill(UDY corporation USA)을 이용하여 20 mesh 이하로 분쇄한 분말을 국립농산물 검사소로부터 제공받아 사용하였다. Capillary Electrophore-

\*Corresponding author : Mee-Ra Rhyu, Food Chemistry and Biotechnology Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Seongnam-si, Kyeonggi-do 463-420, Korea  
Tel: 82-31-780-9268  
Fax: 82-31-709-9876  
E-mail: mrrhyu@kfri.re.kr

sis(CE)는 Beckman P/ACE 5500 system(Beckman, Fullerton, CA, USA)을 이용하였다.

### Capillary, 시료 추출 및 분석조건

Capillary는 uncoated fused-silica capillary(50  $\mu$ m I.D.  $\times$  27 cm, 20 cm inlet to detector)를 사용하였다. 시료의 추출에는 60% 1-propanol, 30% ethanol, 30% ethanol in 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5) 중 추출율 및 분리도가 가장 좋은 30% ethanol을 이용하였으며 시료에 2.5 배량의 30% ethanol을 가하여 상온에서 1시간 stirring한 후 20분간 원심분리(10,000 $\times$ g)하고 0.22  $\mu$ m micro filter로 여과한 후 15시간 이내에 분석하였다. 분석 전압은 15 kV로 하였으며 온도는 45°C로 하고 모든 시료는 pressure injection 하였다. 분석의 재현성 확보를 위하여 증류수, 0.1 M phosphate buffer, 1 M phosphoric acid, 분석 buffer를 이용하여 capillary의 cleaning protocol을 확립하여 적용하였다.

### Buffer 및 시약

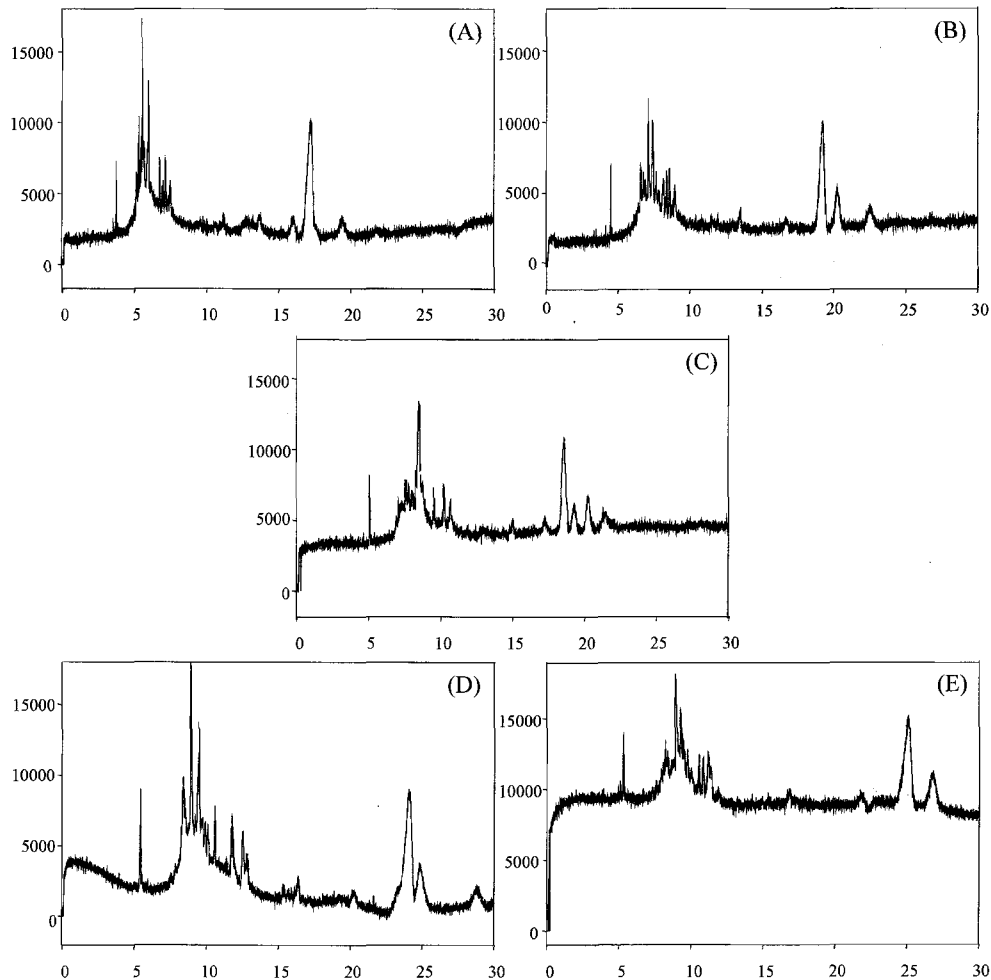
분석 buffer로는 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5)에 poly-

meric modifier로 hydroxypropylmethylcellulose(HPMC)를 0.05% 첨가하여 사용하였으며 organic modifier 및 detergent 첨가에 따른 분리도 개선 효과를 검토하였다. Organic modifier로 acetonitrile, ethylene glycol, methanol, 2-methoxyethanol 및 propanol을, zwitterionic detergents로 CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfate), lauryl sulfobetain(SB-12) (N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)과 octyl-sulfobetain(SB3-8) (N-octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)을, nonionic detergent로 Brij-35(propylene 23 lauryl ether)를 사용하였으며 hexane sulfonic acid(HSA)와 iminodiacetic acid(IDA)도 사용하였다. Buffer는 모두 Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA, USA)로부터, HPMC와 각 detergent는 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, organic modifier들은 HPLC grade를 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 분석 buffer 조성에 따른 변화

CE를 이용하여 곡류 단백질 분석 시 가장 문제가 되는 것



**Fig. 1. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of Job's-tears separated with 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, containing 0.05% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) plus an organic modifier; 20% acetonitrile (A), 20% methanol (B), 20% ethylene glycol (C), 20% propanol (D) or 20% methoxyethanol (E).**

Separations were carried out in 27 cm (20 cm separation length)  $\times$  50  $\mu$ m I.D. capillaries at 15 kV and 45°C. Samples were pressure-injected (20 sec).

은 capillary의 내막과 분석하는 단백질간의 소수성 상호작용으로 이의 해결을 위하여 몇 가지 방법이 제안되어 있다. 그 중 하나가 상대적으로 친수성이 강한 organic modifier를 분석 buffer에 첨가하여 소수성 상호작용을 변화시켜 주는 것으로<sup>(13)</sup> 분석 buffer에 organic modifier, acetonitrile, ethylene glycol, methanol, methoxyethanol, propanol을 각각 20% 농도로 첨가하여 분석하였다. Acetonitrile, methanol, ethylene glycol, propanol, methoxyethanol의 순으로 전체 peak의 용출시간이 늦어졌으며(Fig. 1) 이중 acetonitrile은 분석 시간은 단축되나 peak의 분리도 면에서 분석시간 10분 이내에 나타나는 peak들이 서로 붙어 정확한 분리가 어려웠고 ethylene glycol은 baseline의 안정과 용출시간 면에서 안정적인 경향을 나타내었으나 5~10분 사이의 peak들의 분리도가 좋지 못했고 propanol은 baseline과 용출시간 면에서, methoxyethanol은 용출시간이 늦어 전체 분석시간이 너무 길어지는 것으로 나타났다. Baseline의 안정도, peak의 분리도 및 peak의 용출시간 모두를 고려하였을때 organic modifier로는 methanol(Fig. 1 (B))이 적합한 것으로 판단되었다.

단백질과 capillary의 내막의 상호작용을 변화시켜주는 다

른 방법의 하나로 detergent의 효과를 비교하였다. 20% methanol을 첨가한 buffer에 6종의 detergent를 각각 26 mM 농도로 첨가하여 peak pattern의 변화를 관찰한 결과(Fig. 2) detergent를 첨가하기 전(Fig. 1 (B))에 비해 SB-12, SH3-8 및 HSA를 첨가한 경우 baseline이 안정적이며 peak의 분리도 개선효과를 나타내었다. 이중 특히 HSA를 첨가한 경우 peak의 용출시간이 단축되며 동시에 분리도 개선효과가 가장 큰 것으로 판단되었다(Fig. 2 (C)). 그 외 IDA, Brij-35, CHAPS는 baseline이 안정적이지 않은 등 울무시료의 분석에는 부적합한 것으로 평가되었다.

울무추출물과 capillary 내막의 상호작용 감소를 위한 organic modifier로는 methanol, detergent로는 HSA를 첨가하여 일부 시료에 대한 예비실험을 실시한 결과 retention time 5~10분 사이의 peak들에서 원산지에 따른 차이의 도출 가능성이 나타나 이들 peak의 분리도 개선을 시도하였다. Methanol 농도를 20, 30, 40%로 증가할수록 전체 peak의 용출시간이 늦어져 40%에서는 peak의 확산현상이 나타났고 methanol의 농도 30%에서 5~10분 경에 용출되는 peak의 분리도가 적절히 개선되었다(Fig. 3).

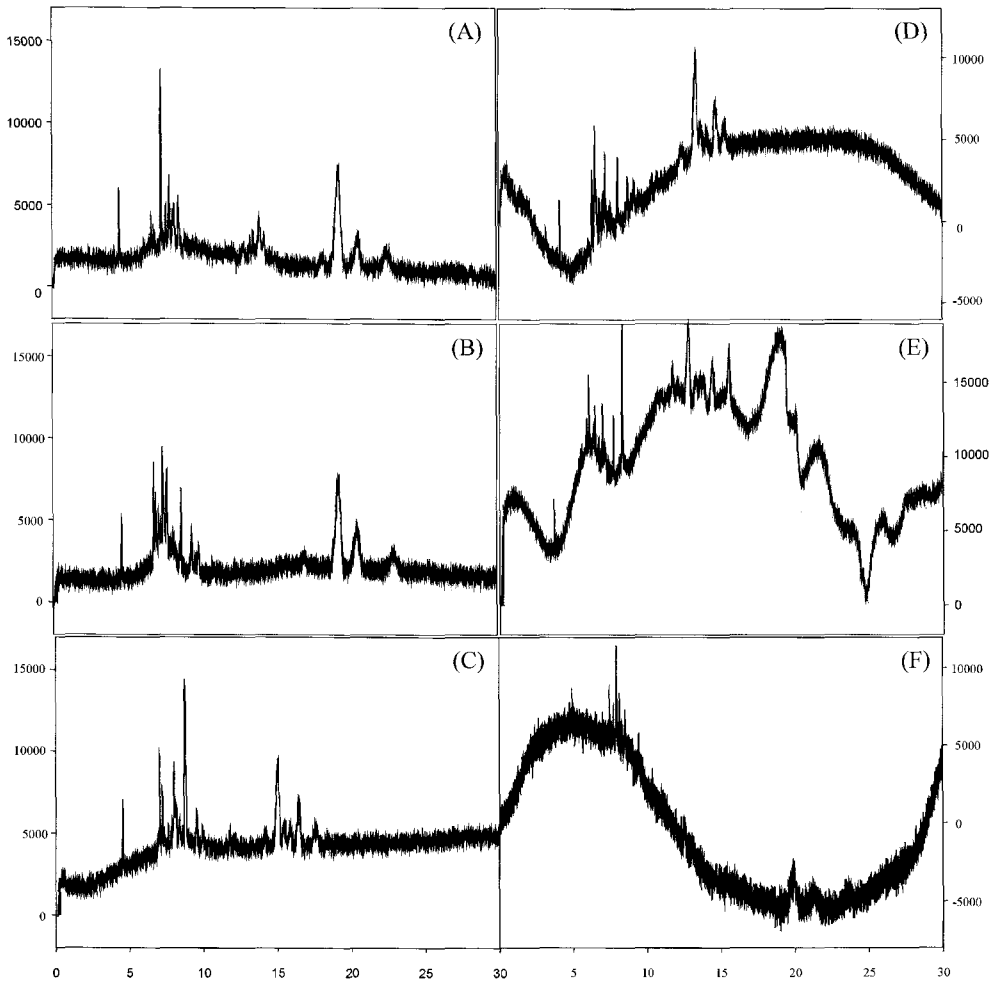


Fig. 2. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of Job's-tears using the following separation buffers: 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, containing 0.05% HPMC plus 20% methanol (P-MeOH) + 26 mM laurylsulfobetain (A), P-MeOH + 26 mM octyl-sulfobetain (B), P-MeOH + 26 mM hexane sulfonic acid (C), P-MeOH+26 mM iminodiacetic acid (D), P-MeOH+26 mM Brij-35 (E) or P-MeOH+26 mM CHAPS (F).

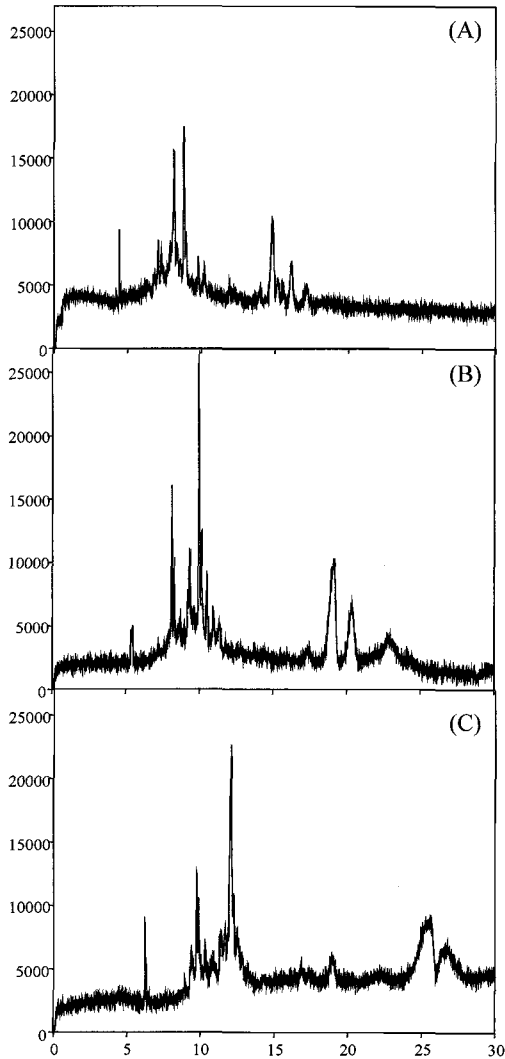


Fig. 3. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of Job's-tears using the following three buffer systems: 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, containing 0.05% HPMC plus 26 mM hexane sulfonic acid (P-HSA) + 20% methanol (A), P-HSA + 30% methanol (B) or P-HSA + 40% methanol (C).

#### 기타 분석 조건의 영향

분석 buffer 외에 기타 분석조건에 따른 울무의 CE 분석 pattern의 변화를 관찰하기 위하여 우선적으로 injection time을 10~30초까지 변화시켜 CE pattern을 비교하였다. Injection time을 10초로 한 경우 baseline이 안정되고 분석시간은 단축되었으나 5~10분 경에 관찰되는 peak들의 크기가 너무 작아 명확히 구분이 어려운 반면 injection time을 30초까지 증가한 경우 peak의 확산현상이 나타나 본 실험에서는 baseline 및 peak의 분리도면에서 모두 안정적으로 나타난 20초를 최적 조건으로 하였다(data not shown).

CE peak pattern에서 peak의 확산현상을 일으키는 원인 중 하나는 detector와 recorder에서 data를 읽는 속도가 느린 것을 들 수 있으며 이는 기계의 detector rise time을 변화시켜 줌으로써 어느 정도 해소가 가능한 것으로 알려져 있다<sup>(14)</sup>. Detector rise time은 detector에서 그 data 최종 값이 10~90%까지 증가하는데 걸리는 시간을 의미하며 짧아질수록 peak

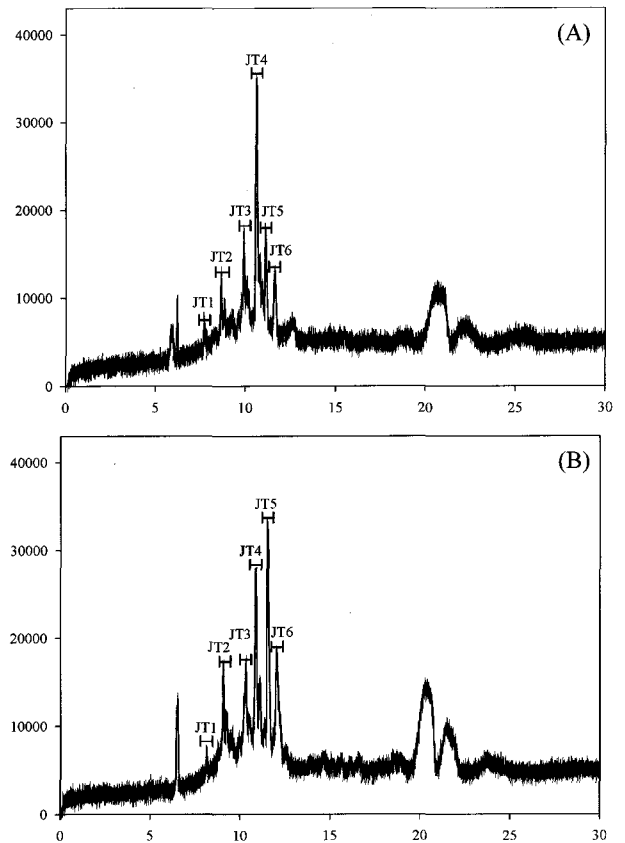


Fig. 4. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of Job's-tears with domestic (A) and foreign (B) origin. Separation buffers were 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, containing 0.05% HPMC and 26 mM hexane sulfonic acid, plus 30% methanol.

가 sharp해지는 경향을 나타내고 기계에 따라 다르나 0.1~1초로 변화가 가능하다. 따라서 본 연구에서도 detector rise time을 0.1~1초까지 증가시켜 비교하였으며 peak resolution이 가장 뛰어난 0.1초를 분석에 적용하였다(data not shown).

CE를 이용한 분석의 재현성을 검토하여 sample injection 전에 증류수 및 0.1 M P buffer로 각각 5분간 rinse한 후 분석 buffer로 10분간 평형화시키고 20초간 pressure injection하여 30분간 분석을 수행하였다. 또한 분석 종료 후 다음 분석시료에 영향을 미치지 않게 하기 위하여 1 M phosphoric acid로 14분간 rinse하여 분석 반복에 따른 오차를 최소화하였다.

#### 울무 원산지 판별에의 적용

도출된 결과에 따라 분석 buffer로는 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5, containing 0.05% HPMC)에 30% methanol과 26 mM HSA를 첨가하고 시료는 20초간 pressure injection, detector rise time은 0.1초로 하여 2000년과 2001년 산 국산 및 수입산 울무 총 240점을 분석하였다. 국산 및 수입산에서 peak의 전체적인 pattern은 유사하였으며 2000년과 2001년의 생산년도에 따라서도 동일한 결과를 나타내었다. 그러나 용출된 peak를 6개의 peak 또는 peak group 즉, JT1~JT6로 분류하였을 때 retention time 약 11~12분에 나타나는

JT5의 용출 pattern이 수입산과 국산에서 뚜렷한 차이를 나타내었다(Fig. 4). 즉, 국산 울무에서는 용출되는 peak의 대체로 중심에 JT4가 주된 peak로 나타나고 JT5는 다른 peak group과 큰 차이를 나타내지 않지만(Fig. 4 (A)) 수입산 울무에서는 JT4를 비롯한 JT1, JT2, JT3, JT6은 국산울무에서와 동일하게 나타나지만 JT5가 JT4보다 더 큰 주요 peak로 나타나 뚜렷이 구분되었다(Fig. 4 (B)). 이 peak JT5에 의한 국산 및 수입산 울무의 판별율은 2000년 시료에서는 국산이 총 47점 중 39점(판별율 약 83%), 수입산은 총 48점 중 39점(판별율 약 81%), 2001년 시료는 국산 총 74점 중 60점(판별율 약 81%), 수입산은 총 71점 중 59점(판별율 약 83%)이었으며 전체적으로 약 82%의 판별율을 나타내었다. Peak JT5에 의해 뚜렷이 구분되지 않은 시료들은 대부분 국산은 수입산 시료의 peak pattern에, 수입산은 국산 시료의 peak pattern에 가깝게 나타났으며 이는 산지는 다르나 시료의 품종 및 재배조건이 서로 동일 또는 유사한 경우로 추정되나 정확한 원인규명을 위해서는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

농산물의 원산지 판별은 정확성이 요구되나 대부분의 경우 한가지 실험법으로 완벽히 판별 하기는 어려우며 서로 다른 분석법을 통한 결과의 신뢰도 제고가 필요시 되고 있다. 현재 울무의 원산지 판별을 위해 다른 분석법이 적용된 연구는 발견되지 않아 본 연구결과와 비교하기 어려우며 이는 울무의 원산지를 속이는 불법유통 문제가 우리나라에 국한되어, 그리고 최근에 발생한 문제인 탓으로 사료된다. 본 연구를 통하여 울무의 원산지를 완벽하게 판별할 수 있는 조건이 도출되지는 않았으나 울무 원산지 판별법의 하나로 CE 분석법의 활용 가능성이 제시되었다.

## 요 약

수입자유화이후 유입량이 급증한 농산물중 하나인 울무의 원산지 판별을 위하여 CE의 적용가능성을 검토하였다. 분석을 위한 지표물질의 추출을 위해 30% ethanol을 사용하였으며, 50 µm I.D.×27 cm(20 cm inlet to detector)의 capillary를 이용하여 45°C, 15 kV로 200 nm에서 detect 하였다. 분석 buffer는 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5)에 30% methanol과 26 mM HSA를 첨가하였으며, pressure injection 20초, detector rise time 0.1초로 하였다. 분석시 초기에 증류수와 0.1 M phosphate buffer(pH 2.5)로 각 5분씩 capillary를 rinse하고 분석 buffer로 10분간 equilibration 시킨 후 30분간 분석하고 다시 1 M phosphoric acid로 14분간 rinse하여 다음 시료 분석시의 오차를 줄였다. 이 조건으로 2000년 및 2001년의 국산 및 수입산 울무 총 240점을 분석한 결과 서로를 구분하는 peak JT5의 도출이 가능하였으며 이 peak JT5에 의한 국산 및 수입산 울무의 판별율은 2000년 시료에서는 국산이 총 47점 중 39점(판별율 약 83%), 수입산은 총 48점 중 39점(판

별율 약 81%), 2001년 시료는 국산 총 74점 중 60점(판별율 약 81%), 수입산은 총 71점 중 59점(판별율 약 83%)이었으며 전체적으로 약 82%의 판별율을 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 지원으로 수행된 연구결과와 일부로 이에 감사드리며 시료 수집 및 전처리에 협조해 주신 국립농산물품질관리원 시험연구소 김수정 팀장님께 감사드립니다.

## 문 헌

1. Bean, S.R., Bietz, J.A. and Lookhart, G.L. High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *J. Chromatogr. A* 814: 25-41 (1998)
2. Wehr, T. Capillary electrophoresis of proteins. *Adv. in Chromatogr.* 37: 227-361 (1997)
3. Chen, F-T. A. Rapid protein analysis by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 559: 445-453 (1991)
4. Bietz, J.A. and Schmalzried, E. Capillary electrophoresis of wheat proteins: optimization and use for varietal identification (Abstr.). *Cereal Foods World* 37: 555 (1992)
5. Bietz, J.A. and Schmalzried, E. Improved wheat varietal identification by acidic capillary electrophoresis (Abstr.). *Cereal Foods World* 38: 615 (1993)
6. Lookhart, G.L. and Bean, S.R. Rapid differentiation of oat cultivars and rice cultivars by capillary zone electrophoresis. *Cereal Chem.* 72: 312-316 (1995)
7. Lookhart, G.L. and Bean, S.R. Improvements in cereal protein separations by capillary electrophoresis: resolution and reproducibility. *Cereal Chem.* 73: 81-87 (1996)
8. Righetti, P.G., Oliviere, E. and Viotti, A. Identification of maize lines via capillary electrophoresis of zeins in isoelectric, acidic buffers. *Electrophoresis* 19: 1738-1741 (1998)
9. Lookhart, G.L., Bean, S.R. and Jones, B.L. Separation and characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) hordeins by free zone capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 20: 1605-1612 (1999)
10. Bean, S.R., Lookhart, G.L. and Bietz, J.A. Acetonitrile as a buffer additive for free zone capillary electrophoresis separation and characterization of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* 48: 318-327 (2000)
11. Rhyu, M.R., Kim, E.Y., Ahn, M.O. and Kim, S.S. Discrimination of domestic rice cultivars by capillary electrophoresis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1252-1258 (1998)
12. Rhyu, M.R., Kim, E.Y., Kim, S.S. and Chang, Y.S. Regional differences of four major rice cultivars in Korea by capillary electrophoresis. *Food Sci. Biotechnol.* 10: 299-304 (2001)
13. Campos, C.C. and Simpson, C.F. Capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. Sci.* 30: 53-58 (1992)
14. Lucy, C.A., Yeung, K.K.-C., Peng, X. and Chen, D.D.Y. Extraseparation peak broadening in capillary electrophoresis. *LC-GC.* 16: 26-31 (1998)

(2002년 8월 5일 접수; 2002년 10월 4일 채택)