J Plant Biotechnol (2010) 37:12-24
DOI:10.5010/JPB.2010.37.1.012

Review

식물대사체 연구의 현황과 전망

김석원 · 권용국 · 김종현 · 유장렬

Present and prospect of plant metabolomics

Suk Weon Kim · Yong Kook Kwon · Jong Hyun Kim · Jang R. Liu

Received: 17 February 2010 / Accepted: 26 February 2010
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Plant metabolomics is a research field for identifying all of the metabolites found in a certain plant cell, tissue, organ, or whole plant in a given time and conditions and for studying changes in metabolic profiling as time goes or conditions change. Metabolomics is one of the most recently developed omics for holistic approach to biology and is a kind of systems biology. Metabolomics or metabolite fingerprinting techniques usually involves collecting spectra of crude solvent extracts without purification and separation of pure compounds or not in standardized conditions. Therefore, that requires a high degree of reproducibility, which can be achieved by using a standardized method for sample preparation and data acquisition and analysis. In plant biology, metabolomics is applied for various research fields including rapid discrimination between plant species, cultivar and GM plants, metabolic evaluation of commercial food stocks and medicinal herbs, understanding various physiological, stress responses, and determination of gene functions. Recently, plant metabolomics is applied for characterization of gene function often in combination with transcriptomics by analyzing tagged mutants of the model plants of *Arabidopsis* and rice. The use of plant metabolomics combined by transcriptomics in functional genomics will be the challenge for the coming year. This review paper attempted to introduce current status and prospects of plant metabolomics research.

Keywords Chemometircs, metabolomics, metabolic profiling, multivariate statistical analysis, plant functional genomics

S. W. Kim (✉) · Y. K. Kwon
한국생명공학연구원 생물자원센터
(Biological Resources Center)
e-mail: kimsw@kribb.re.kr

J. H. Kim · J. R. Liu
한국생명공학연구원 식물시스템연구센터
(Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon, 305-806, Korea)

서 론

최근 애기장대, 벼, 포플러 등 다양한 식물종의 전체유전자 염기서열 분석이 완료된 이후 각각의 유전자 기능을 이해하기 위해 여러 오믹스 연구 분야의 개발이 이루어지고 있다. 이중에서 메타볼로믹스 (metabolomics)는 생물체내 대사산물의 질적 또는 양적 변화를 다양한 기기분석을 통해 조사하고 이를 토대로 세포 또는 생물의 다양한 생리현상이나 기작을 총체적 수준에서 해석하는 연구 분야이다 (Fig. 1). 즉 식물 대사체 (plant metabolomics) 연구는 식물 세포 및 조직에 존재하는 모든 대사산물의 시간적, 공간적 변화를 추적 조사함으로써 식물의 복잡한 생리 현상을 총체적으로 이해하는 연구 분야이다. 최근 식물 대사체 연구분야는 유전체학에서 제공되는 풍부한 생물학적 정보와 분석 기기의 발달에 힘입어 기능유전체학의 연구 수단은 물론 식물의 종, 품종, 더 나아가 GM 식물의 식별, 대사조절 기작 규명, 유용물질 생산, 식물의 다양한 생리적 반응 이해 등 다양한 연구 분야에서 새로운 관심이 이루어지고 있다 (Table 1, 2). 최근 들어 식물대사체 연구 분야의 발표 논문 건수를 PubMed (2010.02.19)를 통해 검색한 결과 식물 대사체 관련 연구 논문들이 매년 큰 폭으로 증가하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2).

식물은 신진대사에 필요한 다양한 화합물을 직접 생산한다. 식물계 전체에 존재하는 대사산물의 종류는 약 9만에서 20만 종류 이상 존재하는 것으로 추정되고 있다

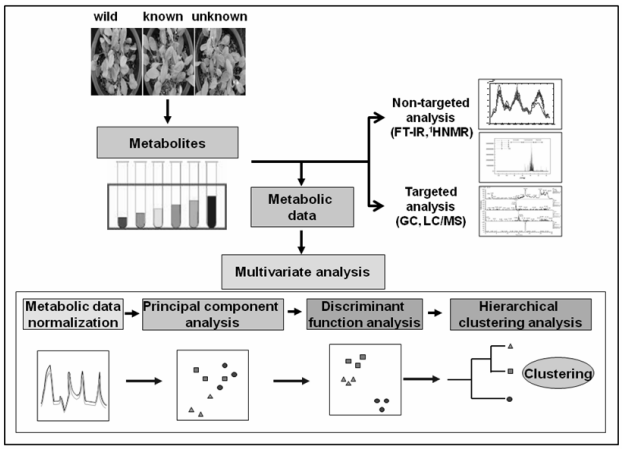

Fig. 1 General principle of plant metabolomics approach.

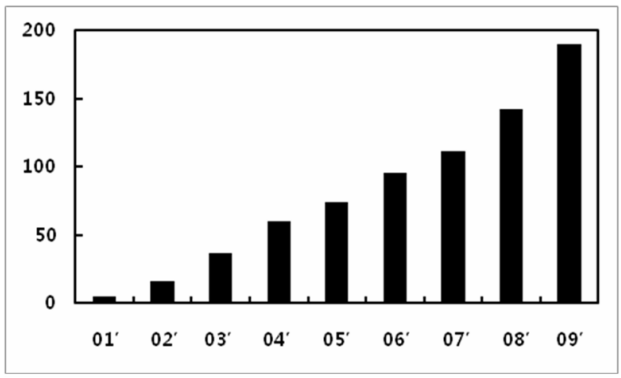

Fig. 2 Annual publications of plant metabolomics approach. (PubMed, 2012.2.19)

(Roessner et al. 2001). 연구 모델식물인 애기장대의 경우 약 5천 종류의 대사산물을 가지고 있는데 이는 특정 미생물과 동물이 가지고 있다고 추정되는 1천5백과 2천5백 종류에 비하면 대단히 많은 숫자이다. 이와 같은 식물체 내의 저분자 대사산물은 효소반응의 기질과 중간산물 또는 최종산물로써 활용되며 이들의 양적, 질적 패턴변화는 궁극적으로 세포 또는 생물의 표현형 (phenotype)을 결정하게 된다. 이 중 많은 화합물이 인간에게는 식품, 의약, 염료, 향신료 등의 원천 소재로 이용되고 있어서 우리 생활에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 이와 같은 유용물질의 상업적 생산을 위하여 최근 이들 대사산물의 생체내 작용 기작 및 기능 이나 대사경로 기작 규명 연구 등을 통해 대사산물에 대한 이해의 폭이 더욱 넓어지고 있으며 이에 따라 식물 대사체 연구에 대한 관심이 더욱 크게 증가하고 있다.

식물 대사체 연구 초창기인 2000년 초반에서부터 현재에 이르기까지 대사체 시료의 준비 및 분석 방법 표준화 체계 확립, 분석 기장비의 해상도 및 분해능 향상, 통계분석 알고리즘의 개발을 통해 날로 변모하고 있다. 식물 대사체 연구에 이용되고 있는 식물 재료는 초창기인 2000년 초에는 모델식물인 애기장대를 주로 사용한 보고들이 많았지만 다양한 응용 분야 개척이 이루어지면서 현재는 애기장대를 포함하여 포도, 인삼, 당귀, 밀, 브로콜리, 해바라기, 토마토, 감자 등 주요 식량작물 및 약용작물 등을 대상으로 적용 범위가 크게 확대되고 있다. 이와 같은 분석 시료의 다양화는 식물대사체 연구의 응용 및 활용 가능성이 점점 확대 되고 있음을 시사하고 있다고 볼 수 있다.

대사체 연구의 궁극적인 목표는 대사과정 또는 대사경로를 총체적 입장에서 이해하고 해석하는 것이다. 따라서 식물 대사체 연구 역시 대사경로 규명을 목적으로 시스템 생물학 입장에서 대사경로를 이해하는 방향으로 발전하고 있다. 본 보고에서는 식물 대사체 연구의 현황 및 다양한 응용 분야를 소개함으로써 향후 식물 대사체 연구의 활용 전망을 고찰하고자 한다.

식물종, 품종 및 GM 작물의 판별

식물대사체 연구의 가장 활발한 응용 분야 중 하나는 식물의 종, 품종 더 나아가 야생종과 GM 작물 사이의 조기 식별 및 판별 분야이다 (Table 1). 현재까지 식물의 종, 품종, 변종 등의 식별은 주로 분자분류 기술이나 식물의 형태적 특성에 따른 분류 구분이 주로 이루어지고 있다. 이에 반하여 대사산물의 패턴 분석 기법에 의한 식물종 및 품종 식별 기술은 각 시료의 복잡한 대사산물 패턴을 다변량통계분석 기법으로 쉽게 판별 및 예측이 가능하여 매우 신속하게 진행 될 수 있다. 하나의 예로 애기장대 메탄올 추출물의 ^{1}H NMR 조사로 각 ecotype간의 판별이 가능하며 ecotype간에 sugar 및 fumaric acid 함량이 차이가 커서 이들 대사산물이 각 ecotype를 구분하는 대사체 마커로 활용이 가능함을 보고 (Ward et al. 2003)한 바 있다. 이후 FT-IR 스펙트럼 분석에 의한 식물 종 구분 (Gidmana et al. 2003; Kim et al. 2004), ^{1}H NMR 스펙트럼 분석에 의한 Ephedra 속 식물의 구분 (Kim et al. 2005), GC/LC-MS 분석을 통한 식물종 구분 (Arbona et al. 2010), GC-MS 분석을 통한 *Echinacea purpurea* 식물종 구분 (Houa et al. 2010) 등 다양한 식물체로부터 대사산물 패턴분석을 통한 식물의 종 구분이 가능하다는 연구결과들이 보고되고 있다.

식량 자원이나 원예 식물종에서 품종의 조기 식별은 우량 품종의 상업화 과정에서 매우 중요하다. 대사산물 패턴분석 기술은 식물의 종 이하 분류체계인 변종이나 품종의 식별에 활용이 가능하다. 본 연구팀에서 8개의 *Catharanthus roseus* cultivar로부터 ^{1}H NMR 스펙트럼 분석 결과와 대표적인 분자분류기술인 RAPD나 AFLP 분석 결과와 상호 비교한 결과 대사산물 패턴 분석을 통해서 분자분류기술과 거의 대등한 수준에서 cultivar 식별이 가능

Table 1 Major application fields for plant metabolomics

Funtional caregory	Plant species	Analytic instrument	Statistic algorithm	References
Species Cultivar GM plant discrimination	*Arabidopsis thaliana*	HNMR	PCA, PLSDA	Ward et al. 2003
	E. purpurea	GC-MS	PCA	Hou et al. 2010
	Ephedra species	HNMR	PCA	Kim et al. 2005
	plant species	LC-MS, GC-MS	PCA	Arbona et al. 2009
	plant species	FT-IR	PCA, HCA	Kim et al. 2009
	B. distachyon, A. thaliana	FT-IR	DFA, CVA	Gidman et al. 2003
	Catharanthus roseus	HNMR	PCA	Kim et al. 2007
	potato	FIE-MS	RF (random forest)	Beckmann et al. 2007
	strawberry	FT-IR	PCA, LDA	Kim et al. 2009
	pea	HNMR	PCA, PLS, LDA	Charlton et al. 2004
	lettuce	GC-APCI/EI-MS	fold change	Garratt et al. 2005
	Arabidopsis thaliana	HNMR, CNMR	PLSDA	Tian et al. 2007
	Arabidopsis thaliana	HNMR	PLSDA	Ren et al. 2009
	Arabidopsis thaliana	GC-MS	PCA, HCA	Messerli et al. 2007
	Nicotiana tabacum	FT-ICR-MS	fold change	Mungur et al. 2005
	Broccoli	UV	ANOVA-PCA	Luthria et al. 2008a
	Broccoli	DIMS	ANOVA-PCA	Luthria et al. 2008b
Quality Origin evaluation	green tea	UPLC-TOF-MS	PCA, PLSR	Pongsuwan et al. 2007
	green tea	GC-TOF-MS	PCA, PLSR	Pongsuwan et al. 2008
	Angelica acutiloba	HNMR	PLSDA, PSLR	Tarachiwin et al. 2008
	Angelica acutiloba	UPLC/TOF MS	PCA, PLSDA	Tianniam et al. 2009
	Angelica acutiloba	PY-GC-MS	PCA, PLSDA	Tianniam et al. 2010
	wine	HNMR	PCA, PLSDA, OPLSDA	Son et al. 2009
	wheat	HNMR	PCA	Baker et al. 2006
	ginseng	HNMR	PCA, PLSDA	Lee et al. 2009
	Astragalus	HNMR	PCA, CDA	Shin et al. 2009
	ginseng	HNMR	PCA, CDA	Shin et al. 2007
	wheat	HNMR	PCA	Baker et al. 2006
	potato	FT-IR, HNMR	PCA	Kim et al. 2009

함을 보고한 바 있다 (Kim et al. 2007a). 식물 대사체 연구를 통해 품종의 신속한 식별 및 판별은 감자 (Beckmann et al. 2007) 에서도 보고된 바 있다. 원예적 가치가 높은 상업용 품종의 경우, 딸기의 품종의 식별이 가능하며 (Kim et al. 2009b), 브로콜리 (Luthria et al. 2008a; Luthria et al. 2008b)의 품종 식별도 가능하다. 그러나 아직 대사산물의 패턴차이와 이들의 유전자형의 차이와 직접적인 연관을 규정하지는 못하고 있는 상황이다. 따라서 이들의 상관관계를 찾는 연구가 수반되고 대사산물의 차이에 기여하는 유전자 규명이 이루어지면 보다 명확한 품종 식별 기술로 활용이 가능할 것이다. 즉, 대사산물 패턴분석에 의한 신속한 품종 식별 기술은 품종의 육성과정에서 부계 및 모계의 유전자형을 신속히 판별함으로써 관행육종에서 품종의 고정에 요구되는 시간을 단축하여 조속한 품종 및 계통 확립에 기여 할 수 있을 것으로 예상된다.

야생종과 외래 유전자가 도입된 GM작물의 구분은 분자생물학적 분석을 통해 도입 및 마커 유전자의 존재 유무를 조사함으로써 간단한 검증할 수 있다. 그러나 도입 유전자가 대사산물의 생합성 조절에 관여하는 유전자라면 대사산물의 기기분석을 통해서도 쉽게 검증이 가능하다. 이처럼 대사산물 패턴분석 기술은 GM작물의 형질전환 여부는 물론 도입 유전자의 효과, 즉, 특정 목표 대사산물의 생산성 변화 및 도입 유전자로 인한 전반적인 대사산물의 패턴 변화를 동시에 추적 조사할 수 있는 장점을 가지고 있다. 대사산물 패턴분석 기술에 기반한 GM작물의 식별은 콩 (Charlton and Allnutt, 2004), 상추 (Garratt and Linforth, 2005), 담배 (Choi et al. 2004; Mungur et al. 2005), 애기장대 (Messerli et al. 2007; Tian et al. 2007; Ren

et al. 2009) 등 여러 작물에서 보고된 바 있다. 특히 Messerli (2007) 등은 유사한 표현형을 보이는 다양한 돌연변이체들로부터 GC-MS를 이용하여 대사산물의 양을 측정하고, 측정된 대사산물의 함량에 따라 돌연변이주들의 유연관계를 규명하고 더 나아가 대사산물의 생합성 과정에서 어떻게 연결되는 지를 조사한 바 있다. 이처럼 대사산물의 패턴분석 기술은 다수의 GM작물로부터 우량 형질을 가진 우수라인의 조기 선발 수단으로 향후 활용성이 크게 증대될 것으로 사료된다.

품질 평가

의약품 및 식품제조에는 엄격한 품질 관리 규정이 요구된다. 그러나 현재 시중에서 유통되는 농수축산물 및 이의 가공산물의 식별은 관련 전문가 육안관찰에 의한 고전적 감별법이 주로 활용되고 있다. 따라서 식품의 안정성 제고 측면에서 유용 약초나 기능성식품, 축산 사료 등의 경우 보다 표준화된 다양한 품질 평가 수단의 개발이 요구되고 있다. 식물대사체 연구는 이러한 요구에 신속하고 효율적으로 대응할 수 있는 수단으로 활용이 이루어지고 있다(Table 1).

식물의 생장은 유전적 요소와 재배환경적 요소에 의해 영향을 받는다. 따라서 비록 유전자형이 동일하더라도 재배환경이 상이하면 두 개체 사이에는 대사체 수준에서 차이가 나타나게 된다. 이러한 대사산물의 차이점은 두 개체의 차별화하는 수단으로 활용이 가능하다. 식물대사체 연구는 이러한 재배 환경적 요인의 특성을 규명하여 식물의 최종 품질을 결정하는 도구로 활용이 되고 있다. 녹차의 경우 잎으로부터 대사산물을 GC-TOF-MS (Pongsuwan et al. 2007)나 UPLC-TOF-MS (Pongsuwan et al. 2008)로 측정하여 PCA분석을 통해 각 시료별 품질 순위를 결정한 다음 정확한 품질을 예측할 수 있는 PLS예측 모델을 보고 한 바 있다. 대표적인 한약재인 당귀 (*Angelica acutiloba*)의 경우도 UPLC-TOF-MS 분석 후 대사산물 패턴분석을 통해 각 재배 지역별 구분이 가능함을 보고한 바 있다 (Tarachiwin et al. 2008; Tianniam et al. 2009; Tianniam et al. 2010). 중국의 약재로부터 약효 성분인 aristolochic acid의 존재 유무를 확인 수단으로 활용이 이루어지고 있다 (Jacob et al. 2007). 인삼의 경우 역시 ^{1}H NMR 분석을 통해 아시안산 및 미국산 인삼의 구분은 물론 홍삼 등 인삼 가공식품의 식별이 가능하다 (Lee et al. 2009). 더 나아가 인삼 (Shin et al. 2007)이나 황기 (Shin et al. 2009)의 경우 대사산물 패턴분석을 통해 재배 연근의 식별도 가능하다. 또한 와인의 경우도 ^{1}H NMR 및 HPLC분석을 통해 포도의 생산연도, 생산지역 등에 따른 구분이 가능하다 (Pereira et al. 2006; Anastasiadi et al. 2009). 아울러 ^{1}H NMR 기반 대사체 연구는 와인의 제조과정에서 효모를 통한 발효과정을 시간별로 추적함으로써 발효의 전과정 및 최종 품질 평가가 가능하다 (Son et al. 2009). 이상의 연구 결과들로 미루어 볼 때 식물대사체 연구는 다양한 가공식품이나 기능성식품의 품질 평가는 물론 원산지의 식별 수단으로 적극적인 활용이 가능할 것으로 기대된다. 아울러 다양한 발효과정에서 이루어지는 대사산물의 패턴 변화를 추적할 수 있으므로 이들 과정의 표준화 및 과학적 체계화 수단으로 활용이 가능 할 것으로 기대된다.

최근 국내외적으로 GM 작물에 대한 기대와 이의 안정성에 우려가 교차되고 있다. 도입 유전자의 안정성 및 부작용에 대한 사회의 우려를 잠재우기 위해서는 야생종과 도입 GM 작물사이의 전체 대사산물의 패턴을 비교 분석하여 안정성을 검토하는 것 또한 하나의 대안이다. 현재까지 토마토 (Le Gall et al. 2003), 벼 (Oberdoerfer et al. 2003), 감자 (Catchpole et al. 2005; Colquhoun et al. 2006) 밀 (Baker et al. 2006; Shewry et al. 2007) 등 여러 작물에서 야생종과 GM 작물사이의 전체 대사산물의 비교 분석이 이루어지고 있다. Baker 등은 (2006) GM 밀을 서로 다른 지역에서 3년에 걸쳐서 재배를 한 후에 그 시료의 분석을 수행한 결과 야생종과 형질전환체의 차별화도 이루어지지만 그것보다는 재배 지역과 재배 년도에 따라서 더 큰 차이를 보인다는 흥미로운 보고를 하였다. 본 연구팀에서도 GM 감자와 야생종을 FT-IR 및 ^{1}H NMR 스펙트럼 조사 후 PCA, LDA 분석을 수행한 결과 저온 저장이 이루어진 야생종 감자의 대사산물 패턴 변화가 야생종 및 GM 감자 사이에서의 변화보다 훨씬 크게 이루어짐을 보고한 바 있다 (Fig. 3)(Kim et al. 2009a). 현재 전세계적으

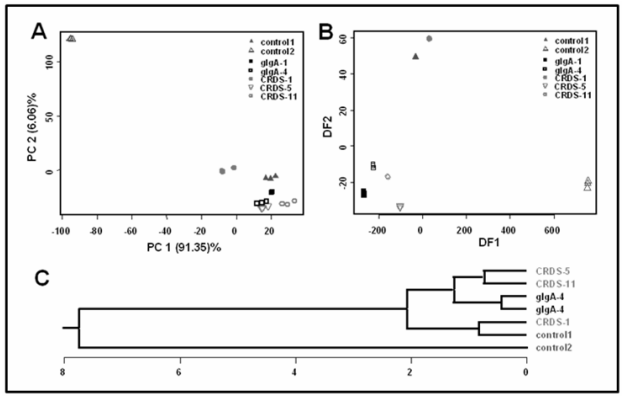

Fig. 3 PCA-score plot (A), LDA-score plot (B) and dendrogram of HCA (C) for ^{1}H NMR spectral data from several *CRDS*- or *glg*A-expressing potato tubers and two control Desiree tubers (Control 1 and 2). A: Two-dimensional PCA-score plot of FT-IR data. The first two principal components, which accounted for 91.35% and 6.06% (97.41% total) of the total variation, respectively, are shown. B: LDA-score plot of PCA-score data. C: Dendrogram based on HCA of the PCA-score data. Symbols represent replicates of each tuber line

로 매우 다양한 GM 작물의 개발이 이루어지고 있다. 이들 GM 작물에서 도입 유전자의 안정성 평가는 반드시 수행해야 될 과제이다. 특히 유전자 도입 과정에서 이루어지는 knockout effect는 염기서열 분석이 이루어지지 않은 작물에서는 분석에 어려움이 따른다. 따라서 식물대사체 연구는 대사산물 수준에서 GM 작물의 안정성 및 동등성 평가 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다. 아울러 대사산물 수준에서 부정적 효과를 나타내는 GM 식물체를 조기 선발 제거함으로써 우량 엘리트 라인을 조기에 신속하게 선발하는 수단으로 활용이 가능할 것이다.

다양한 생리현상 규명

유전적, 환경적 요인의 변화는 식물 대사과정의 질적 또는 양적 변화를 초래하며 식물은 대사기작의 조절을 통하여 이와 같은 다양한 생리적 변화에 적응을 할 수 있게 된다. 식물대사체 연구는 식물체에서 이루어지는 여러 생리적 기작이나 현상을 규명하고 이의 총체적 이해를 위한 효율적인 연구 수단으로 활용이 이루어지고 있다(Table 2). 아울러 이와 같은 접근 방법은 환경요인에 대한 적응 과정에서 수반되는 농수산물이나 한약재의 상

Table 2 Major application fields for plant metabolomics

Funtional caregory	Plant species	Analytic instrument	Statistic algorithm	References
Understanding physiological response	tomato	HNMR	PCA, PLSDA	Deborde et al. 2009
	tomato	HNMR, LC-MS, GC-MS	PCA, SOM	Mounet et al. 2007
	strawberry	FT-IR	PCA	Kwak et al. 2007
	barley, rice, *Brachypodium*	GC-MS	GC-MS	Parker et al. 2009
	Catharanthus roseus	2D-NMR	PCA	Choi et al. 2004
	tomato	FT-IR	PCA, DFA	Shin et al. 2010
	ginseng	HNMR	fold change	Jung et al. 2006
	Arabidopsis thaliana	HNMR	PCA, fold-change	Kim et al. 2007
	sunflower, bread wheat	NIRS	ANOVA-PCA	Sarembauda et al. 2007
	tangerine peel	HPLC	HELP method, PCA	Yi et al. 2009
	Artemisia annua L	GC-MS	PCA, PLSDA	MA et al. 2008
	Datura innoxia Mill.	UFLC-ESI-HRMS	PLSDA	Jousse et al. 2010
	melon	GC-MS, HNMR	fold change	Biais et al. 2010
	opium oppy	HNMR	OPLSDA, PCA	Zulak et al. 2008
	Arabidopsis thaliana	FT-ICR/MS	PCA, fold change	Gray et al. 2005
	Arabidopsis lyrata ssp.	HPLC, GC	PCA, ANOVA	Davey et al. 2009
	Arabidopsis thaliana	GC-MS	HCA, PCA	Korn et al. 2010
	Arabidopsis thaliana	HPLC-TOF-MS	PCA, HCA, ANOVA	Boccard et al. 2007
	Arabidopsis thaliana	UPLC-TOF-MS	PLSDA, PCA	Grata et al. 2008
	Arabidopsis thaliana	GC-MS	PCA, HCA, SAM	Sun et al. 2010
	Arabidopsis thaliana	GC-MS	ICA	Trenkamp et al. 2009
	sunflower	GC-MS	non-parametric analysis	Peluffo et al. 2010
	grapevine	NMR	PCA, PLSDA, HCA	Ali et al. 2009
	Camptotheca acuminata	HPLC, ESI-MS	monitoring HPLC-MS/MS	Montoro et al. 2010
Gene function	*Arabidopsis thaliana*	GC-MS	t-test, PCA	Fiehn et al. 2000
	Arabidopsis thaliana	HNMR, Microarray	SAM, visual comparison	Huang et al. 2009
	Arabidopsis thaliana	FT-ICR-MS, Microarray	PCA	Hirai et al. 2004
	Poplar	GC-MS, DNA-chip, qRT-PCR	ANOVA, SAM	Luo et al. 2009
	Arabidopsis thaliana	HPLC, qRT-PCR	PCA	Gluser et al. 2010
	Arabidopsis thaliana	HPLC, ESI-MS, FT-MS, Microarray	PCA	Tohge et al. 2005
	Arabidopsis thaliana	Microarray	BL-SOM analysis	Hirai et al. 2005

품성 변화와 직결되어 있어 다양한 상업적 활용이 기대되고 있다.

토마토의 대사체 분석을 통한 성숙과정의 이해는 식물 대사체 연구의 대표적인 접근방식의 하나이다. 토마토가 꽃이 피고 열매가 성숙되는 과정을 발달단계별로 구분하고, 열매의 씨 부분과 과육 부분으로 나누어 각기 ^{1}H NMR 및 LC, GC 등 기기분석을 통하여 씨의 발달과정 및 과육의 발달과정에서 이루어지는 전체 대사산물의 변화를 추적하여 각 시기별 주요 대사산물의 변화를 일목요연하게 관찰 할 수 있게 되었다 (Mounet et al. 2007). 이와 같은 접근 방식으로 토마토의 품종별, 재배 방법별 대사산물의 차이를 조사한 결과 품종별 성분 차이보다는 성숙단계 즉 수확시기가 전체 대사산물의 양적, 질적 패턴변화에 더 중요한 차별화 요인임을 밝혀졌다 (Deborde et al. 2009). *Camptotheca acumin*에서도 생장 단계별 대사산물 패턴 변화가 조사 된 바 있으며 (Montoro et al. 2010), 본 연구팀에서도 딸기의 성숙 단계별 대사산물의 패턴변화를 FT-IR로 조사한 결과 당 성분 변화가 크게 이루어짐을 보고한 바 있다 (Kwak et al. 2007). 농수산물의 경우, 장단기 저장과정에서 대사산물의 변화를 조절하여 신선도를 유지하는 것이 상품성 제고에 중요한 요소이다. 해바라기와 밀의 저장성과정에서 적외선 분석과 ANOVA-PCA 분석을 연계하여 저장 시간 및 저장 온도에 따른 저장 상태의 변화를 추적함으로써 저장상태에 미치는 요인을 분석하였다 (Sarembaud, et al. 2007). 메론의 저장과정에서도 메론의 부위별 당 성분의 차이가 보고된 바 있다 (Biais et al. 2010). 이처럼 대사산물의 패턴 변화는 재배 또는 수확이 이루어진 농수산물의 상품성을 결정하는 핵심 요소이다. 따라서 농수산물의 상품성을 제고하기 위한 다양한 연구 과정에서 식물 대사체 연구의 접근 방식을 도입하게 되면 보다 양질의 농수산물 상품성 제고 방안 도출에 효과적인 접근 방안으로 활용을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

한약재의 경우 약재의 재배 방법이나 채취시기에 따라 성분이 변화된다. 식물 대사체 연구는 이와 같은 한약재 원재료 식물의 표준화를 위한 연구 수단으로 활용이 가능하다. 개똥쑥의 발달단계별 artemisinin 함량을 GC-MS로 분석결과 개화기 이후에 artemisinin 축적이 증가 (Ma et al. 2008)되며, 수확 시기에 따른 귤 껍질의 약효 성분 함량 변화 (Yia et al. 2009), elicitor를 처리한 후 시간 경과에 따른 양귀비의 주요 metabolite의 함량 변화 (Zulak et al. 2008), *Datura innoxia*로부터 *Agrobacterium rhizogenes* 접종 후 뿌리와 잎에서 tropane alkaloid의 함량 변화 (Balkhi et al. 2010) 등 한약재를 재료로 다변량통계분석 기법을 도입한 연구들이 보고되고 있다. 이와 같은 연구 결과들은 전통 약재의 경우 어느 시기의 약재 채취가 가장 적당한 것인지 결정하는데 도움을 주게 된다. 따라서 식물 대사체 연구는 각 약재의 표준성분 연구 결과와 연계를 통하여 한약재의 표준화에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

질병 진단을 위한 대사체 연구는 동물 분야 특히 인체의 경우 질병 진단 및 예후 조사를 위한 바이오 마커로써 상업적 활용이 가장 활발한 연구분야이다. 특히 대사체 마커의 경우 DNA 달리 후생유전적 (epigenetic) 변화의 영향으로 유발된 생물체의 변화를 감지할 수 있는 지표로써 맞춤약물요법 시대를 여는 핵심 열쇠라 할 수 있으며, 바이오 의약품 연구에 있어 전략적 쟁점이 되고 있다. 식물병원균에 대한 대응기작 규명이나 발병 진단은 작물의 생산성과 직접적으로 연관되어 있다. 따라서 동물과 마찬가지로 식물 대사체 연구는 생물적 또는 환경적 요인의 변화가 식물에 미치는 영향을 조사하기 위한 연구수단으로 활용이 예상된다. *Catharanthus roseus* 잎에 phytoplasma가 감염되면 phenylpropanoids 또는 terpenoid indole alkaloids 함량이 증가됨을 1H NMR 분석을 통해 보고한 바 있다 (Choi et al. 2004). 최근 *Magnaporthe grisea* 감염에 따른 숙주 식물 (보리, 벼, 및 *Brachypodium distachyon*) 에서 이루어지는 공통적인 대사산물 패턴 이 존재함을 밝혔다 (Parker et al. 2009). 해바라기의 경우 genotype에 따라 *Sclerotinia sclerotiorum* 감염에 따른 대사산물 패턴 변화가 이루어짐을 밝혀 냈다 (Peluffo et al. 2010). 포도의 경우 내병성 및 감수성 품종에 따른 대사산물 패턴 차이를 규명하여 병원균에 대한 바이오마커로 활용 가능성이 제시 되었다 (Ali et al. 2009). 이처럼 식물 질병의 표지물질, 즉 대사체 마커의 탐색 및 활용은 식물에서 병원균에 의한 질병 발병 여부 조기 진단이나 질병의 메커니즘 파악 및 효율적인 방제 수단 개발에 효과적인 도구로 활용이 가능할 것이다.

또한 식물대사체 연구는 여러 환경 스트레스가 식물의 대사산물 패턴 변화에 미치는 영향을 조사하는 수단으로 활용이 가능하다. 염분 스트레스가 토마토의 열매의 대사산물 패턴 변화에 미치는 영향을 FT-IR 분석을 통해 조사된 바 있다 (Johnson et al. 2003). 이 외에도 저온 스트레스 (Gray et al. 2005; Davey et al. 2009; Korn et al. 2010), 상처 (Boccard et al. 2007; Grata et al. 2008), 중금속 (Sun et al. 2010), 제초제 (Trenkamp et al. 2009) 등 다양한 스트레스 요인들의 작용기작이 식물 대사체 연구를 통해 연구되고 있다. 본 연구그룹에서도 애기장대 현탁 배양세포로부터 탄소원 결핍이 미치는 영향 (Fig. 4)(Kim et al. 2007b), glutamine이 인삼 모상근의 뿌리 생장에 미치는 영향 (Jung et al. 2006) 등을 보고한 바 있다. 최근 식물세포벽의 분해과정에 관여하는 미생물인 *Saccharophagus degradans*의 대사에 관한 연구 (Shin et al. 2010)가 보고된 바 있다. 이처럼 식물과 미생물의 상호작용를 식물 대사체 연구를 통해 이해하려는 시도들이 증가할 것으로 예상된다. 특히 환경 스트레스가 식물에 미치는 영향을 분

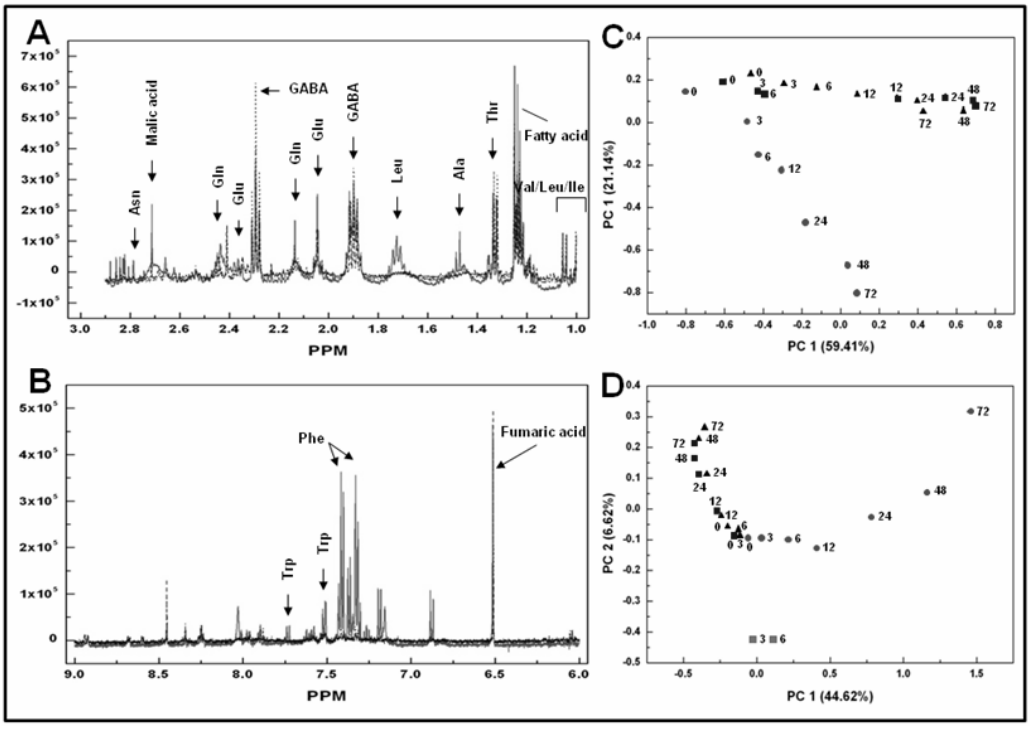

Fig. 4 Peaks assignment from 1H NMR spectrum of aliphatics (A) and aromatics (B) during sucrose starvation. Red solid line (--), blue dashed line (--), and black dotted line (--) represent 0%, 3%, and 6% sucrose treatment, respectively. Each peak was assigned by comparison to peak signals from standard chemicals subjected to 1H-NMR spectroscopy. PCA score plots from the aliphatic (C), and aromatic regions (D) of 1H NMR spectral data during sucrose starvation. Symbols represent 0% (●), 3% (■), and 6% (▲) sucrose treatment and values on the PCA plot represent mean of three replicates. The numbers represent culture period of each sucrose starvation treatment

석 하는 연구는 microarray 데이터와 연계를 통해 총체적 접근을 시도하는 연구들이 보고되고 있다. 따라서 식물 대사체 연구는 생물학적, 환경적 요인들이 식물체에 미치는 영향을 해석하는 도구로 활용이 증대될 것으로 기대된다.

유전자 기능 분석

식물분야에서 최근에 대사체 연구에 관심을 가지게 된 직접적 계기는 식물의 유전자 기능 분석과 밀접하게 연관되어 있다. 즉, 애기장대 혹은 벼와 같은 모델식물의 게놈 염기서열분석이 완료된 이후 확보된 무수한 유전자들의 기능을 규명하기 위하여 여러 분석 기법들이 활용되고 있다. 이중 대표적인 유전자 기능 정의 방법으로 특정 유전자가 tagged mutant를 제작하여 wild type과 형태적으로 어떻게 구별되는 지를 분석함으로써 tagged gene의 기능을 정의하고 있다. 그러나 이와 같은 접근 방법으로는 구조 분석이 완료된 무수한 유전자들의 기능을 일일이 정의하기에는 분명한 한계를 가지고 있으며 보다 빠르고 간편한 방법으로 유전자의 기능을 유추하기 위한 수단으로 최근 대사체 연구 기법들이 연계되어 활용되고 있다. 표현형에 기초한 유전자 기능분석 연구에 있어서 커다란 문제점은 애기장대 knockout mutant의 90%이상이 형태적 변화를 수반하지 않는 silent mutant라는 점이다. 이런 돌연변이주의 경우 유전자의 기능을 metabolic profiling을 통해서 인지할 수 있다 (Fiehn et al. 2000). 이처럼 표현형이 수반되지 않는 대사조절 유전자의 경우 식물 대사체 연구를 통해 유전자 기능 정의가 이루어지고 있다 (Tohge et al. 2005; Fellenberg et al. 2009) (Table 2).

FANCY (functional analysis by co-responses in yeast)는 효모 (*Saccharomyces cervisae*)의 knock out mutant를 이용하여 유전자 기능 예측이 가능하다는 보고로 각 mutant를 개별적으로 metabolic profile한 후 다변량통계분석 하게 되면 클러스터링 패턴에 따라 유전자의 기능을 예측할 수 있다 (Raamsdonk et al. 2001). 이 방법을 이용하여 식물 tagged mutant의 metabolic profiling을 통하여 미지의 유전자의 기능을 대량으로 유추해 볼 수 있을 것이다. 현재 본 연구그룹에서는 애기장대의 tagged mutant와 anthocyanin 생합성 조절 유전자의 knock out mutant를 이용하여 FT-IR 스펙트럼 분석 기법을 활용하여 anthocyanin 생합성 tagged mutant의 선발 및 기능 정의를 시도하고 있다.

그러나 실제 식물체에서 이루어지는 다양한 metabolism은 복잡한 network으로 연결되어 있으므로 metabolic profiling만으로 간단하게 해당 유전자의 기능을 정의할 수는 없다. 따라서 DNA microarray 등 다른 결과들과 연계하여 해석을 해야만 보다 정확하게 기능 정의가 가능할 것이다. 이처럼 대사체 (metabolome)과 유전체 (transcriptome) 데이터의 상호 연계를 통해 유전자의 기능 정의 및 생리현상을 총체적으로 해석하고자 연구가 진행되고 있다. 애기장대의 nutrition 및 2차 대사과정에 관련된 transcriptome 데이터와 FT-MS 등의 metabolome 데이터와 연계를 통하여 식물의 대사과정을 총체적으로 해석 접근하는 시도된 바 있다 (Hirai et al. 2004). 또한 microarray 데이터를 이용하여 intensity 값을 측정한 후 알려진 gene과 novel gene의 clustering을 통하여 유전자의 잠재적인 기능을 예측하고 in vitro에서 novel gene의 기능을 metabolite와 연계시켜 유전자의 실제적인 기능을 정의한 보고 (Hirai et al. 2005)도 이루어지고 있다. 최근에는 애기장대의 drought 와 NaCl에 처리에 따른 microarray와 metabolite profiling 데이터 연계 (Huang et al. 2009), 애기장대 뿌리의 ectomycorrhizas 처리에 따른 대사산물 변화와 어떠한 mRNA가 발현이 되는지 DNA-chip 데이터와 연계 (Luo et al. 2009)등 metabolite와 transcript를 연결시켜 abiotic stress를 해석하는 시도들이 증가하고 있다. 이는 tagged mutant 만으로 결정할 수 없는 많은 유전자의 기능을 효과적으로 밝히기 위한 방법으로 애기장대의 특정 조건과 식물부위에서의 non-targeted metabolic profiling과 DNA microarray를 연계하여 해당 mutant를 유발하는 유전자의 기능을 보다 효과적으로 정의할 수 있게 될 것이다.

대사체 데이터 표준화, 통계분석 알고리즘 및 분석 장비의 다양화

식물 대사체 연구 초창기인 2000년 초반에서부터 현재에 이르기까지 대사체 시료의 준비 및 분석 방법은 물론 분석기기에 이르기까지 많은 발전이 이루어졌다. 특히 대사체 연구의 진전은 분석 기장비의 해상도 및 분해능 향상에 힘입은 바가 크다. 분석기기의 변화 양상을 보면 FT-IR, ^{1}H NMR 등 non-target 대사체 분석에서 출발하여 화합물의 직접적인 동정이 가능한 GC-TOF-MS (Almstetter et al. 2009), LC-TOF-MS (t'Kindt et al. 2009) 등으로의 변화가 이루어지고 있다 (Table 3). 즉 대사산물의 전체적인 패턴변화도 중요하지만, 대사산물 각각의 양적 변화를 보다 정확하게 분석해야만 복잡한 대사체 네트웍을 이해할 수 있기 때문이라 사료된다. ^{1}H NMR 분석 방법도 어느 정도 대사산물의 정량 분석이 가능하지만, 양을 결정할 수 있는 metabolite의 수가 GC-MS, LC-MS 비해 적기 때문에 특정 metabolite의 양을 알기 위해서는 target 대사체 분석 방법이 주로 사용되고 있다 (Dunn et al. 2005). 최근에는 보다 신속하고 재현성이 높은 데이터 분석을 위해 P NMR (DeSilva et al. 2009) 및 DART-TOF-MS (Zhou et al. 2010) 등 분석 장비의 다양화가 이루어지고 있다. FT-ICR/MS (Takahashi et al. 2008; Han et al. 2008) 방법은 가장 정밀한 측정이 가능하지만 고가의 분석 장비이기 때문에 식물 대사체 연구의 보편화된 분석기기는 아니다. 장비의 보급이 원활해지고, FT-ICR/MS로 측정된 단일 화합물들의 데이터가 쌓이게 된다면 대사체 분석에서 FT-ICR/MS의 사용이 증가할 것으로 예상된다.

대사체 연구의 활성화에 기여한 또 다른 핵심 요소는 다변량 통계분석 알고리즘이다. 또한 대사체 데이터 분석에 필수적인 다변량 통계분석기법 역시 응용범위가 확대됨에 따라 다양한 알고리즘들이 개발되고 있다. 초기의 metabolite의 분석으로 사용된 방법은 전체적인 metabolite pattern의 변화를 보기 위한 방법으로 PCA, PLSDA 기법이 많이 사용되었다. Metabolite 측정을 하게 되면, data의 형태가 spectrum의 형태로 나오게 된다. non-target metabolite fingerprinting을 하면, 전체 metabolite가 나오기 때문에 모든 metabolite의 양을 규정하는 것이 어렵다. 때문에, spectrum의 전체를 종속변수로 정하면, 기계에 따라서 다르지만, 1000개에서 80000개의 변수가 나오게 되고 이 변수들은 각 차원으로 설정이 된다. 이런 많은 차원을 PCA 방법을 통하여 대표되는 component로 차원을 줄여서 계산을 하게 된다. PCA는 많은 차원을 대표적인 component를 정하여 차원의 수를 줄이는 방법이다. 현재의 경우 metabolite의 개별적인 차이에 중점을 두기 때문에 microarray에서 많이 사용된 SAM의 방법을 많이 사용된다 (Almstetter et al. 2009). SAM을 이용하기 위해서는 metabolite의 low spectrum을 사용할 수 없고, 개별 metabolite의 양을 정해주어야 한다. 따라서 분해능이 뛰어난 GC-MS나 LC-MS의 기법이 발달되고, GC-MS, LC-M에서의 pure compound 데이터가 쌓임에 따라서 spectrum peak에서 metabolite의 종류와 양을 정할 수 있게 되었고, SAM을 이용한 방법이 사용되게 되었다. 이외에도 ICA (independent component analysis) 분석 (Scholz et al. 2004), CCA (canonical correlation analysis) 분석 (Yamamoto et al. 2008), RF (random forest) 분석 (Enot et al. 2006) 그리고 ASCA (ANOVA-simultaneous component analysis) 분석 (Smilde et al. 2005) 기법 등이 사용되고 있다. 그러나 아직까지도 metabolite data의 특성상 많은 차원을 가지고 있기 때문에 PCA와 PLSDA 분석이 많이 사용되고 있다 (Table 1).

대사체 분석 결과의 재현성 향상을 위한 시료 준비 및 분석방법 표준화 노력들도 활발히 진행되고 있다. 식물 시료의 ^{1}H NMR 분석시 시료의 추출 및 시료의 준비 과정을 체계화하였으며 (Kruger et al. 2008; Parker et al. 2008),

Table 3 Key factors in advance of plant metabolomics

Categrory	Sample type	Analytic instrument	Statisitc algorithm	References
Analysis equipment	Escherichia coli	FT-ICR/MS	PCA, PLS	Takahashi et al. 2008
	human serum, mouse urin	UF-FT-ICR/MS		Han et al. 2008
	human serum	PNMR		Silva et al. 2009
	human serum	DART-MS		Zhou et al. 2010
	Escherichia coli	2D GC-TOF-MS	fold change, SAM	Almstetter et al. 2009
	Arabidopsis	LC-MS, GC-MS	PCA	t'Kindt et al. 2009
Statistic analysis algorithm	Arabidopsis thaliana	NE/QTOF-MS	PCA, ICA	Scholz et al. 2004
	green tea	GC-MS	CCA, PLS	Yamamoto et al. 2008
	Arabidopsis thaliana, potato	FIE-MS	RF (random forest)	Enot et al. 2006
	guinea pigs urin	HNMR	ASCA	Smilde et al. 2005
Protocol standardization	sunflower	HNMR	PCA, OPLSDA	Kruger et al. 2008
	Brachypodium distachyon	FIE/MS	PCA, PC-LDA	Beckmann et al. 2008
	Brachypodium distachyon	FIE/MS	PCA, PLSDA, RF	Enot et al. 2008
	Brachypodium distachyon	FIE/MS	LDA	Parker et al. 2008

Brachypodium 잎으로부터 다량의 대사체 분석 시료의 준비과정 (Beckmann et al. 2008)의 체계화가 보고된 바 있다. 또한 FIE-MS 방법을 이용한 대사체 분석시 MS 데이터 전처리 과정 및 분석 방법에 표준화가 시도되었다 (Enot et al. 2008). 이와 같은 대사체 분석 시료의 추출방법 및 얻어진 데이터의 분석 표준화 노력은 식물 대사체 연구 결과의 재현성 향상은 물론 보다 다양한 응용 분야의 개척을 더욱 가속화 시킬 것으로 예상된다.

결 론

대사체 연구의 궁극적인 목표는 복잡한 대사경로 규명을 통한 생명현상 이해 및 유용 대사산물의 효율적 생산이다. 대사산물은 유전자 발현의 최종산물로 궁극적으로 표현형 변화의 주요한 원인이 된다. 즉 metabolome은 생물체의 유전자형과 표현형을 연계하는 가교 역할을 하고 있다. 이와 같은 특성을 이용하여 식물 대사체 연구는 식물조직의 구분, 농산물의 품질 평가, 다양한 생리 기작의 규명 및 궁극적으로 유전자의 기능 연구를 위한 수단으로 활용이 이루어지고 있다. 이처럼 식물 대사체 연구의 활성화는 대사체 시료의 준비 및 분석 방법의 표준화, 다양한 통계분석 분석 알고리즘의 개발은 물론 분석기기 등의 분해능 향상에 힘입은 바가 크다.

식물 대사체 연구를 통한 유전자 기능 분석을 위해서는 돌연변이주가 필수적으로 요구된다. 식물에서는 다양한 tagged mutant 개발이 용이하며 특히 애기장대에 대해서는 DNA microarray가 판매되고 있으므로 이를 이용한 transcriptome 데이터를 쉽게 확보할 수 있다. 또한 GC-MS, LC-MS, FT-MS 등의 분석기기를 이용 하여 대량의 metabolome 데이터를 확보할 수 있다. 따라서 이와 같은 유전체 데이터와 대사체 데이터의 연관 분석을 위한 다양한 생물정보학적 기법이 향후 개발되어야 한다. 이와 같은 유전체 데이터와 대사체 데이터의 연관 분석 체계는 복잡한 대사경로의 해석 및 유전자 기능 정의를 한층 더 가속화 시킬 수 있을 것으로 전망된다. 아직까지 유전체 데이터와 대사체 데이터의 연관 분석은 애기장대에 국한되어 있다. 포플러, 벼 등 더 많은 식물의 genome이 연구되면서 보다 다양한 식물에게 적용될 것으로 기대된다. 이와 같은 여러 omics 분석의 연계는 생명현상을 유전자 하나가 아닌 총체적 접근 즉 시스템 생물학을 통한 해석이 가능해질 것으로 전망된다.

적 요

식물 대사체 (plant metabolomics) 연구는 식물 세포 및 조직에 존재하는 모든 대사산물의 시간적, 공간적 변화를 추적 조사함으로써 식물의 복잡한 생리 현상을 총체적으로 이해하는 연구이다. 이와 같은 식물 대사체 연구는 최근 개발이 이루어지고 있는 여러 오믹스 연구 분야의 하나로 시스템생물학의 한 분야이다. 식물 대사체 연구는 시료로부터 순수 화합물 또는 복합물을 정제하거나 또는 정제가 이루어지지 않은 혼합액으로부터 대사체 스펙트럼 정보를 확보하여 분석이 이루어지므로 추출액 제조 및 얻어진 대사체 데이터의 분석과정의 표준화가 필수적으로 이루어져야 한다. 이는 대사체 분석 결과의 해상도 및 재현성의 확보의 핵심 요소 이다. 식물 대사체

연구는 기능유전체학의 연구 수단은 물론 식물의 종, 품종, 더 나아가 GM 식물의 식별, 대사조절 기작 규명, 유용물질 생산, 식물의 외부 환경 스트레스 요인에 대한 다양한 생리적 반응 이해 등 다양한 연구 분야에서 활용이 이루어지고 있다. 최근 식물 대사체 연구는 모델식물(벼, 애기장대)의 유전체 정보와 연계하여 돌연변이주의 분석을 통해 유전자의 기능 정의 수단으로 활용되고 있다. 따라서 향후 유전체 정보와 대사체 정보의 연계를 통해 복잡한 대사경로 규명이나 다양한 생리 현상 해석 연구가 더욱 활발하게 진행될 것으로 전망된다.

인용문헌

Ali K, Maltese F, Zyprian E, Rex M, Choi YH, Verpoorte R (2009) NMR metabolic fingerprinting based identification of grapevine metabolites associated with downy mildew resistance. J Agric Food Chem 57:9599-9606

Almstetter MF, Appel IJ, Gruber MA, Lottaz C, Timischl B, Spang R, Dettmer K, Oefner PJ (2009) Integrative normalization and comparative analysis for metabolic fingerprinting by comprehensive two-Dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem 81:5731-5739

Anastasiadi M, Zira A, Magiatis P, Haroutounian SA, Skaltsounis AL, Mikros E (2009) 1H NMR-based metabonomics for the classification of greek wines according to variety, region, and vintage. comparison with HPLC data. J Agric Food Chem 57:11067-11074

Arbona V, Iglesias DJ, Talo'n M, Cadenas AG (2009) Plant phenotype demarcation using nontargeted LC-MS and GC-MS metabolite profiling. J Agric Food Chem 57:7338-7347

Baker J, Hawkins N, Ward J, Lovegrove A, Napier J, Shewry P, Beale M (2006) A metabolomic study of substantial equivalence offield-grown genetically modified wheat. Plant Biotechnol J 4:381-392

Beckmann M, Enot DP, Overy DP, Draper J (2007) Representation, comparison, and interpretation of metabolome fingerprint data for total composition analysis and quality trait investigation in potato cultivars. J Agric Food Chem 55:3444-3451

Beckmann M, Parker D, Enot DP, Duval E, Draper J (2008) High-throughput, non targeted metabolite fingerprinting using nominal mass flow injection electro spray mass spectrometry. Nat Protocols 3:435-445

Biais B, Beauvoit B, Allwood JW, Deborde C, Maucourt M, Goodacre R, Rolin D, Moing A (2010) Metabolic acclimation to hypoxia revealed by metabolite gradients in melon fruit. J Plant Physiology 167:242-245

Boccard J, Grata E, Thiocone A, Gauvrit J, Lant'ri P, Carrupt P, Wolfender J, Rudaz S (2007) Multivariate data analysis of rapid LC-TOF/MS experiments from *Arabidopsis thaliana* stressed by wounding. Chemometr Intel Lab Syst 86:189-197

Charlton A, Allnutt T, Holmes S, Chisholm J, Bean S, Ellis N, Mullineaux P, Oehlschlager S (2004) NMR profiling of transgenic peas. Plant Biotechnol J 2:27-35

Choi YH, Tapias EC, Kim HK, Lefeber AWM, Erkelens C, Verhoeven JTJ, Brzin J, Zel J, Verpoorte R (2004) Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using 1H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. Plant Physiol 135(4): 2398-2410

Davey MP, Woodward FI, Quick WP (2009) Intraspecfic variation in cold-temperature metabolic phenotypes of *Arabidopsis lyrata ssp. Petraea*. Metabolomics 5:138-149

Deborde C, Maucourt M, Baldet P, Bernillon S, Biais B, Talon G, Ferrand C, Jacob D, Dumazet HF, Daruvar A, Rolin D, Moing A (2009) Proton NMR quantitative profiling for quality assessment of greenhouse-grown tomato fruit. Metabolomics 5:183-198

Dunn WB, Bailey NJ C, Johnson HE (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. Analyst 130: 606-625

Enot D, Beckmann M, Overy D, Draper J (2006) Predicting interpretability of metabolome models based on behavior, putative identity, and biological relevance of explanatory signals. Proc Natl Acad Sci 103:14865-14870

Enot DP, Lin W, Beckmann M, Parker D, Overy DP, Draper J (2008) Preprocessing, classification modeling and feature selection using flow injection electrospray mass spectrometry metabolite fingerprint data. Nat Protocols 3: 446 - 470

Fellenberg C, B'ttcher C, Vogt T (2009) Phenylpropanoid polyamine conjugate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* flower buds. Phytochemistry 70:1392-1400

Fiehn O, Kopka J, Drmann P, Altmann T, Trethewey R ,Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat Biotechnol 18:1157-1161

Garratt L, Linforth R, Taylor A, Lowe K, Power J, Davey M (2005) Metabolite fingerprinting in transgenic lettuce. Plant Biotechnol J 3:165-174

Gidman E, Goodacre R, Emmett B, Smith A , Jones D (2003) Investigating plant-plant interference by metabolic fingerprinting. Phytochemistry 63:705-710

Glauser G, Boccard J, Rudaz S, Wolfender JL (2010) Mass spectrometry-based metabolomics oriented by correlation analysis for wound induced molecule discovery: identification of a novel jasmonate glucoside. Phytochem Anal 21:95-101

Grata E, Boccard J, Guillarme D, Glauser G, Carrupt PA, Farmer EE, Lucwolfender J, Rudaza S (2008) UPLC/TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. J Chromato B 871:261-270

Gray G, Heath D (2005) A global reorganization of the metabolome in *Arabidopsis* during cold acclimation is revealed by metabolic fingerprinting. Physiologia Plantarum 124:236-248

Han J, Danell RM, Patel JR, Gumerov DR, Scarlett CO, Speir JP, Parker CE, Rusyn I, Zeisel S, Borchers CH (2008) Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Metabolomics 4:128-140

Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, Yano M, Goodenowe DB, Yamazaki Y, Kanaya S, Nakamura Y, Kitayama M, uzuki H,

Sakurai N, Shibata D, Tokuhisa J, Reichelt M, Gershenzon J, Papenbrock J, Saito K (2005) Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. J Biol Chem 280:25590-25595

Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci 101:10205-10210

Hou CC, Chen CH, Yang NS, Chen YP, Lo CP, Wang SY, Tien YJ, Tsai PW, Shyur LF (2010) Comparative metabolomics approach coupled with cell- and gene-based assays for species classification and anti-inflammatory bioactivity validation of *Echinacea* plants. J Nutr Biochem 1873-4847

Huang J, Bhinu VS, Li Xiang, Bashi ZD, Zhou R, Hannoufa A (2009) Pleiotropic changes in *Arabidopsis* f5h and sct mutants revealed by large-scale gene expression and metabolite analysis. Planta 230:1057-1069

Jacob SS, Smith NW, Quigley CL (2007) Assessment of Chinese medicinal herb metabolite profiles by UPLC-MS-based methodology for the detection of aristolochic acids. J Sep Sci 30:1200-1206

Johnson HE, Broadhurst D, Goodacre R, Smith AR (2003) Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. Phytochemistry 62:919-928

Jousse C, Vu TD, Tran TLM, Balkhi MHA, Molini R, Conti MB, Pilard S, Mathiron D, Hehn A, Bourgaudb F, Gontier E (2010) Tropane alkaloid profiling of hydroponic *Datura innoxia* Mill. plants inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. Phytochem Anal 21:118-127

Jung SM, Kim SW, Ban SH, In DS, Jung JD, Chung HJ, Liu JR, Lim YP, Choi DW (2006) Glutamine accumulation inhibits root growth and lateral root formation in ginseng hairy root. Plant Science 170:801-807

Kim HK , Choi YH, Erkelens C, Lefeber A, Verpoorte R (2005) Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using 1H-NMR spectroscopy and principal component analysis. Chem Pharm Bull 53:105-109

Kim HS, Kim SW, Park YS, Kwon SY, Liu JR, Joung H, Jeon JH (2009a) Metabolic profiling of genetically modified potatoes using a combination of metabolite fingerprinting and multivariate analysis. Biotech Bioprocess Eng 14:738-747

Kim SW , Min SR, Kim JH, Park SK, Kim TI, Liu JR (2009b) Rapid discrimination of commercial strawberry cultivars using Fourier transform infrared spectroscopy data combined by multivariate analysis. Plant Biotechnology Reports 3:87-93

Kim SW, Ban SH, Chung H, Cho SH, Chung HJ, Choi PS, Yoo OJ, Liu JR (2004) Taxonomic discrimination of higher plants by multivariate analysis of Fourier transform infrared spectroscopy data. Plant Cell Rep 23:246-250

Kim SW, Ban SH, Jeong SC, Chung HJ, Ko SM, Yoo OJ, Liu JR (2007a) Genetic discrimination between *Catharanthus roseus* cultivars by metabolic fingerprinting using 1H NMR spectra of aromatic compounds. Biotech Bioprocess Eng 12:646-652

Kim SW, Koo BC, Kim JH, Liu JR (2007b) Metabolic discrimination of sucrose starvation from *Arabidopsis* cell suspension by 1H NMR spectral analysis. Biotech Bioprocess Eng 12: 653-661

Korn M, Ga¨rtner T, Erban A, Kopka J, Selbig J, Hincha DK (2010) Predicting Arabidopsis freezing tolerance and heterosis in freezing tolerance from metabolite composition. Molecular Plant 3:224-235

Kruger N, Troncoso-Ponce MA, Ratcliffe RG (2008) 1H NMR metabolite fingerprinting and metabolomic analysis of perchloric acid extracts from plant tissues. Nat Protocols 3:1001 -1012

Kwak CW, Choung DH, Min SR, Kim SW, Liu JR, Chung H (2007) Fast determination of the ripeness stage of strawberries using infrared spectroscopy combined with principal component analysis. Analytical Sciences 23:895-899

Lee EJ, Shaykhutdinov R, Weljie AM, Vogel HJ, Facchini PJ (2009) Quality assessment of ginseng by 1H NMR metabolite fingerprinting and profiling analysis. J Agric Food Chem 57: 7513-7522

Luo ZB, Janz D, Jiang X, Go¨ bel C, Wildhagen H, Tan Y, Rennenberg H, Feussner I, Polle A (2009) Upgrading root physiology for stress tolerance by *Ectomycorrhizas*: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. Plant Physiology 151:1902-1917

Luthria DL, Lin LZ, Robbins RJ, Finley JW, Banuelos GS, Hnrnly JM (2008a) Discriminating between cultivars and treatments of broccoli using mass spectral fingerprinting and analysis of variance-principal component analysis. J. Agric. Food Chem. 56:9819-9827

Luthria DL, Mukhopadhyay S, Robbins RJ, Finley JW, Banuelos GS, Hanrnly JM (2008b) UV spectral fingerprinting and analysis of variance-principal component analysis: a useful tool for characterizing sources of variance in plant materials. J Agric Food Chem 56:5457-5462

Ma C, Wang H, Lua X, Xu G, Liu B (2008) Metabolic fingerprinting investigation of *Artemisia annua* L. in different stages of development by gas chromatography and gas chromatography mass spectrometry. J Chromato A 1186:412-419

Messerli G, Nia VP, Trevisan M, Kolbe A, Schauer N, Geigenberger P, Chen J, Davison AC, Fernie AR, Zeeman SC (2007) Rapid classification of phenotypic mutants of *Arabidopsis* via metabolite fingerprinting. Plant Physiology 143:1484-1492

Montoro P, Maldini M, Piacente S, Macchia M, Pizza C (2010) Metabolite fingerprinting of *Camptotheca acuminata* and the HPLC/ESI-MS/MS analysis of camptothecin and related alkaloids. J Pharm Biomed Anal 51:405-415

Mounet F, Chamley ML,Maucourt M, Cabasson C, Giraudel JL , Deborde C, Lessire R,Gallusci P,Bertrand A,Gaudille` re M,Rothan C, Rolin D, Moinga A (2007) Quantitative metabolic profiles of tomato flesh and seeds during fruit development: complementary analysis with ANN and PCA. Metabolomics 3

Mungur R, Glass A, Goodenow D, Lightfoot D (2005) Metabolite fingerprinting in transgenic *Nicotiana tabacum* altered by the

Escherichia coli glutamate dehydrogenase gene. J Biomed Biotechnol 2:198-214

Parker D, Beckmann M, Enot DP, Overy DP, Rios ZC, Gilbert M, Talbot N, Draper J (2008) Rice blast infection of *Brachypodium distachyon* as a model system to study dynamic host/pathogen interactions. Nat plotocols 3:435-445

Parker David, Beckmann M, Zubair H, Enot DP, Rios ZC, Overy DP, Snowdon S, Talbot NJ, Draper J (2009) Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. Plant Journal 59:723-737

Peluffo L, Lia V, Troglia C, Maringolo C, Norma P, Escande A, Hopp HE, Lytovchenko A, Fernie AR, Heinz R, Carrari F (2010) Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. Phytochemistry 71:70-80

Pereira G, Gaudillere J, Leeuwena C , Hilbert G, Maucourt M, Deborde C, Moing A, Rolin D (2006) 1H NMR metabolite fingerprints of grape berry: Comparison of vintage and soil effects in bordeaux grapevine growing areas. Analytica Chimica Acta 563:346-352

Pongsuwan W, Banba T, Harada K, Yonetani T, Kobayashi A, Fukusaki E (2008) High-throughput technique for comprehensive analysis of Japanese green tea quality assessment using ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. J Agric Food Chem 56:10705-10708

Pongsuwan W, Fukusaki E, Bamba T, Yonetani T, Yamahara T, Kobayashi A (2007) Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. J Agric Food Chem 55:231-236

Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K, Oliver SG (2001) A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. Nat Biotech 19:45-50

Ren Y, Wang T, Peng Y, Xia B, Qu LJ (2009) Distinguishing transgenic from non-transgenic *Arabidopsis* plants by 1H NMR-based metabolic fingerprinting. J Genet Genomics 36: 621-628

Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie A (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. Plant Cell 13:11-29.

Sarembauda J, Pinto R, Rutledge D, Feinberg M (2007) Application of the ANOVA-PCA method to stability studies of reference materials. analytica chimica acta 603:147-154

Scholz M, Gatzek S, Sterling A, Fiehn O, Selbig J (2004) Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. Bioinformatics 20:2447-2454

Shin MH, Lee DY Kirsten, Skogerson GW, Choi IG, Fiehn O, Kim KH (2010) Global metabolic profiling of plant cell wall polysaccharide degradation by *Saccharophagus degradans*. Biotechnol Bioeng 105:477-488

Shin YS, Bang KH, In DS, Kim OT, Hyun DY, Ahn IO, Ku BC, Kim SW, Seong NS, Cha SW, Lee DH, Choi HK (2007) Fingerprinting analysis of fresh ginseng roots of different ages using 1H-NMR spectroscopy and principal components analysis. Arch Pharm Res 30:1625-1628

Shin YS, Bang KH, In DS, Sung JS, Kim SY, Ku BC, Kim SW, Lee DH, Choi HK (2009) Fingerprinting differentiation of *Astragalus membranaceus* roots according to ages using 1H-NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. Biomol Ther 17:133-137

Silva MAD, Shanaiah N, Gowda GAN, Rosa-P´erez K, Hanson BA, Raftery D (2009) Application of ^{31}PNMR spectroscopy and chemical derivatization for metabolite profiling of lipophilic compounds in human serum. Magn Reson Chem 47:74-80

Smilde A, Jansen J, Hoefsloot H, Lamers R, Greef J, Timmerman M (2005) ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): a new tool for analyzing designed metabolomics data. Bioinformatics 21:3043-3048

Son HS, Hwang GS, Kim KM, Kim EY, van den Berg F, Park WM, Lee CH, Hong YS (2009) 1H NMR-based metabolomic approach for understanding the fermentation behaviors of wine yeast strains. Anal Chem 81:1137-1145

Sun X, Zhang J, Zhang H, Ni Y, Zhang Q, Chen J, Guan Y (2010) The responses of *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure explored via metabolite profiling. Chemosphere 78:840-845

Takahashi H, Kai K, Shinbo Y, Tanaka K, Ohta D, Oshima T, Altaf-Ul-Amin Md, Kurokawa K, Ogasawara N, Kanaya S (2008) Metabolomics approach for determining growth-specific metabolites based on Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 391:2769-2782

Tarachiwin L, Katoh A, Ute K, Fukusaki E (2008) Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by 1H NMR-based metabolic fingerprinting. J Pharma Biomed Anal 48: 42-48

Tian C, Chikayama E, Tsuboi Y, Kuromori T, Shinozaki K, Kikuchi J, Hirayama T (2007) Top-down Phenomics of *Arabidopsis thaliana* metabolic profiling by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy and transcriptome analysis of albino mutants. J Biological Chemistry 282:18532-18541

Tianniam S, Bamba T, Fukusaki E (2009) Non-targeted metabolite fingerprinting of oriental folk medicine *Angelica acutiloba* roots by ultra performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. J Sep Sci 32:2233-2244

Tianniam S, Bamba T, Fukusaki E (2010) Pyrolysis GC-MS-based metabolite fingerprinting for quality evaluation of commercial *Angelica acutiloba* roots. J Biosci Bioeng 109:89-93

t'Kindt R, Morreel K, Deforce D, Boerjan W, Bocxlaer JV (2009) Joint GC-MS and LC-MS platforms for comprehensive plant metabolomics: Repeatability and sample pre-treatment. J Chromato B 877:3572-3580

Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima JI, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama MK, Noji M, Yamazaki M, Saito K (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of

Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. Plant J 42:218-235

Trenkamp S, Eckes P, Busch M, Fernie AR (2009) Temporally resolved GC-MS-based metabolic profiling of herbicide treated plants treated reveals that changes in polar primary metabolites alone can distinguish herbicides of differing mode of action. Metabolomics 5:277-291

Ward J, Harris C, Lewis J, Beale M (2003) Assessment of ^{1}H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 62:949-957

Yamamoto H, Yamaji H, Fukusaki E, Ohno H, Fukuda H (2008) Canonical correlation analysis for multivariate regression and its application to metabolic fingerprinting. Biochem Eng J 40:199-204

Yi LZ, Yuan DL, Liang YZ, Xie PS, Zhao Yu (2009) Fingerprinting alterations of secondary metabolites of tangerine peels during growth by HPLC-DAD and chemometric methods. Analytica Chimica Acta 649:43-51

Zhou M, McDonald JF, Fern'ndez FM (2010) Optimization of a direct analysis in real time/ time-of-flight mass spectrometry method for rapid serum metabolomic fingerprinting. J Am Soc Mass 21:68-75

Zulak KG, Weljie AM, Vogel HJ, Facchini PJ (2008) Quantitative 1H NMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures. BMC Plant Biology 8:5