

약용식물의 기원 판별을 위한 Bar-HRM 분석기술의 응용

김윤희 · 신용욱 · 이신우

Practical application of the Bar-HRM technology for utilization with the differentiation of the origin of specific medicinal plant species

Yun-Hee Kim · Yong-Wook Shin · Shin-Woo Lee

Received: 14 November 2017 / Revised: 12 December 2017 / Accepted: 17 January 2018
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The advent of available DNA barcoding technology has been extensively adopted to assist in the reference to differentiate the origin of various medicinal plants species. However, this technology is still far behind the curve of technological advances to be applied in a practical manner in the market to authenticate the counterfeit components or detect the contamination in the admixtures of medicinal plant species. Recently, a high resolution melting curve analysis technique was combined with the procedure of DNA barcoding (Bar-HRM) to accomplish this purpose. In this review, we tried to summarize the current development and bottleneck of processing related to the Bar-HRM technology for the practical application of medicinal plant species' differentiation in a viable global market. Although several successful results have been reported, there are still many obstacles to be resolved, such as limited number of DNA barcodes and single nucleotide polymorphisms, in particular, only one DNA barcode, internal transcribed sequence (ITS) of ribosomal DNA has been reported in the available nuclear genome. In addition, too few cases have been reported about the identification of counterfeit or contamination with processed medicinal plant products, in particular specifically the case of technology based infusion,

jam and jelly products and components in which it is noted that DNA can be thereby degraded during the processing of these products and components.

Keywords Authentication, admixture, Bar-HRM, counterfeits, medicinal plants

서론

현대의학의 지속적인 발전에도 불구하고 약용식물을 이용한 전통 약재, 건강식품, 음료수 등의 세계시장은 꾸준히 증가하고 있다. 전 세계적으로 약용식물은 분류학상 근연관계가 아주 가까운 종에서부터 매우 광범위한 분포도를 보이고 있다. 조사에 의하면 중국에서만 383과(Family), 2,309속(genera)에 속하는 11,146종(species)가 된다고 하였다(Chen et al. 2010). 따라서 전통적으로 알려져 온 이들이 전문가도 구분하기 어려울 정도로 형태학적으로 아주 유사한 종들이 많이 존재할 뿐만 아니라 견과류, 분말, 탕약 등의 가공품으로 유통되면서 위품이나 혼입이 될 경우에는 육안으로는 구분이 거의 불가능하다. 국내에서는 물론 세계시장에 이들 제품이 진출하기 위하여서는 위품이나 혼입 등을 방지할 수 있는 보다 과학적이고 체계적인 기술의 개발이 절실한 실정이다.

DNA 바코드(barcode)는 각 생물종을 구분할 수 있는 일종의 ID 역할을 하는 정보로서, 생명체가 가지고 있는 유전자 중 다른 종과 차이가 있어 종판별에 사용될 수 있는 유전자 영역을 의미한다. ATGC로 구성된 DNA 염기서열의 배열을 비교함으로써 명확한 종 분류가 가능하다는 장점으로, 오랜 경험이 필요한 형태학적 종 분류법 보다 정확하고 쉬운 종판별에 이용되는 유전정보 분석방법을 DNA 바코딩 기술이라 한다. DNA 바코딩 기술은 수확 후 저장이나 가공 등의 처리

Y.-H. Kim
국립경상대학교 사범대학 생물교육과 (농업생명과학연구원)
(Department of Biology Education, College of Education, IALS,
Gyeongsang National University, Jinju, Korea)

Y.-W. Shin · S.-W. Lee (✉)
국립경남과학기술대학교 생명과학대학 농학·한약자원학부
(Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam
National University of Science & Technology, Jinju, Korea)
e-mail: shinwlee@gntech.ac.kr

과정에도 비교적 분해되지 않고 안전한 물질이기 때문에 특정 생물종의 기원을 판별하는데 많이 이용되어 현재는 동·식물은 물론 곰팡이에 이르기까지 광범위하게 응용되고 있다(Kress and Erikson 2008; Chase and Fay 2009; Chase et al. 2005; Hollingsworth et al. 2009). 동물의 경우에는 미토콘드리아 cytochrome C oxidase I (COI) 유전자 단편이 가장 우수한 DNA 바코드로 인정되어 오고 있으나(Hebert et al. 2003), 식물의 경우에는 대부분의 핵 내의 단일 유전자들은 바코드화하기가 어려운 것으로 조사되었으며(Kress et al. 2005), 다양한 염색체 유전자들에 대한 연구가 활발하게 진행되어 오고 있다. 이러한 추세와 함께 약용식물의 기원을 판별하기 위한 다양한 DNA 바코드들도 지속적으로 보고되고 있는 실정이다(Mishra et al. 2016). 그러나 DNA 바코딩 기술은 실제 현장에서 적용하기가 어려운 여러 가지 단점을 갖고 있다. 즉 모든 시료에 대하여 개별적으로 염기서열을 수행하여 비교분석을 하여야하기 때문에 시간과 비용이 많이 요구되며, 두 가지 이상의 약용식물이 유통시장에서 서로 혼입된 경우에 이들에 대한 DNA를 분리하여 염기서열 분석을 수행할 경우 서로 다른 염기서열의 혼재로 분석결과가 정확하지 않거나 읽을 수가 없는 경우가 허다하다. 뿐만 아니라 모르는 미지의 약용식물의 혼입 여부 또는 위품 여부를 판별하기 위하여 모든 계통의 염기서열을 분석하여 비교하여야 한다.

따라서 최근에는 DNA 바코딩 영역에서 판별하고자 하는 약용식물 종에 대한 염기서열을 비교 분석 한 후 서로 다른 단일염기다형성을 포함하는 allele-specific 프라이머를 제작하여 polymerase chain reaction (PCR) 분석으로 나타나는 밴드의 유무로 판별하는 연구결과가 많이 보고되었다(Kim et al. 2013a; Lee et al. 2017a). 하지만 이 기술의 단점도 첫째는 아주 유사한 종의 경우에 충분한 단일염기다형성을 찾을 수가 없는 경우가 많으며, 둘째는 단지 하나 혹은 두 개의 단일염기다형성을 이용하여 제작한 20여개의 염기서열로 구성된 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행할 경우 allele-specific 증폭반응에 실패하는 경우가 많아 실용화의 큰 걸림돌이 되고 있다. 따라서 최근에는 allele-specific 프라이머 조합을 디자인할 때 프라이머의 3'-말단에 단일염기다형성이 위치하도록 한 다음 5'-말단 쪽으로 2, 3, 4번째 염기를 임의로 변경하여 디자인함으로써 100% allele-specific annealing만 일어나도록 하여 정확한 allele DNA 단편만 증폭이 되도록 한 amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR 기술을 적용한 연구결과도 지속적으로 보고되고 있다. 예를 들면 형태학적으로 아주 유사하여 위품 또는 혼용이 사회적인 문제로 제기된 바 있는 백수오(*Cynanchum wilfordii*)와 이엽우피소(*C. auriculatum*)를 판별하기 위하여 ITS, matK, trnL-trnF 유전자 바코드 내 단일염기다형성을 찾아내어 이들이 3'-말단에 위치하도록 디자인 한 후 5'-말단 쪽으로 3번째 염기를 임의로 다른 3종류의 염기로 변경하여 디자인한 다양한 종류의 프라이머 조합을 사용하여 ARMS-PCR을 수행한 결과 가장 판별력

이 우수한 프라이머 조합을 선별할 수 있었다(Han 등, 2016; 2017).

최근에는 보다 신속하고 정확도가 높은 기술을 개발하고자 DNA barcoding (Bar) 기술과 high-resolution melting (HRM) curve pattern 분석기술을 혼합한 Bar-HRM 분석기술을 사용한 연구 보고서가 축적되고 있다. HRM 기법은 Real time PCR을 이용한 분석방법으로 PCR 산물이 DNA 서열에 따라 고유의 Tm (melting temperature)를 갖는 것을 이용한 SNP 분석 기법이다. PCR 산물이 만들어질 때 DNA 이중 가닥에 끼어 들어가는 intercalating dye를 첨가하게 되면 PCR 산물에 끼어 들어가는 형광 파장을 방출하게 되며, 이때 온도를 낮은 온도에서 높은 온도로 서서히 올리면 PCR 산물은 고유의 Tm 값에서 이중가닥에서 단일 가닥으로 바뀌게 되고 형광 값이 급격히 떨어지게 된다. 이때의 Tm 값의 차이를 구분하여 PCR 산물에서 서열 하나의 차이까지 구분해내는 기법이다. HRM 곡선 패턴 비교분석 기술은 극도로 민감하여 목표로 하는 유전자단편의 복제수가 극히 낮은 경우에도 검출이 가능한 기술로 알려져 병원균등의 검사와 같은 임상진단분야에서 널리 사용되고 있는 기술이다(Er and Chang 2012). 최근 HRM 분석기술은 이질적인 집단에서 돌연변이를 확인하거나(Krypuy et al. 2006; Montgomery et al. 2007), RNA 편집의 확인 및 정량 분석(Chateigner-Boutin and Small. 2007), DNA methylation 분석(Wojdacz and Dobrovic, 2009), 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)의 확인(Wu et al. 2008) 등 그 응용분야가 꾸준히 증가하고 있다.

따라서 본 논문에서는 Bar-HRM 분석기술을 이용한 약용식물의 기원 판별에 관한 연구현황을 조사하고 그 문제점을 파악하고 향후 보다 개선된 기술의 개발을 위한 연구과제들을 논하였다.

HRM 곡선 패턴 분석기술을 이용한 약용식물의 기원판별용 바코드 개발 현황

약용식물의 기원판별을 위하여 보다 신속하고 효율적인 Bar-HRM 기술을 적용하기 위하여서는 무엇보다도 가장 효율적이고 적용범위가 넓은 DNA 바코드를 확인하는 연구가 먼저 수행되어야 한다. 따라서 현재까지 보고된 약용식물을 대상으로 확인된 DNA 바코드들의 연구결과들을 종합하여 Table 1에 요약하였다.

이들을 상세하게 검토하여보면, Jaakola et al. (2010)은 진달래과(Ericaceae)에 속하는 bilberry (*Vaccinium. myrtillus* L.), lingonberry (*V. vitis-idaea* L.), bog bilberry (*V. uliginosum* L.), Blueberry (*V. corymbosum*, *V. angustifolium*), crowberry (*Empetrum nigrum* L.), 가시나무과(Crossulariaceae)에 속하는 gooseberry (*Ribes uva-crispa* L.), Caprifoliaceae과에 속하는 honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.), 장미과(Rosaceae)에 속하는 mountain shadbush (*Amelanchier bartramiana*) 등 총 8종을 판별하기 위

Table 1 List of DNA barcodes for the authentication of medicinal plant species based on the HRM curve pattern analyses

Target Region Locus/Loci	Plant Species	Country	References
<i>ITS</i> , <i>trnL-trnF</i> , <i>rpl36-psb8</i>	<i>Ericaceae</i> (berry species)	Finland	Jaakola et al., 2010
<i>matK</i>	<i>Veratrum nigrum</i> , <i>Helleborus niger</i>	Austria	Mader et al., 2011
101 intergenic spacers (IGS)	<i>Panax</i> spp.	South Korea	Kim et al., 2013
<i>ITS2</i>	<i>Sideritis</i> spp.	Greece	Kalivas et al., 2014
<i>rbcL</i> , <i>trnL</i>	<i>Phyllanthus</i> genus	Thailand	Buddhachat et al., 2015
<i>rbcL</i>	<i>Acanthus ebracteatus</i> , <i>Andrographis</i> <i>paniculata</i> , <i>Rhinacanthus nasutus</i>	Thailand	Osathanunkul et al., 2015a
<i>matK</i> , <i>rbcL1</i> , <i>rbcL2</i> , <i>rbcL3</i> , <i>rpoC</i> , <i>trnL</i> , <i>ITS1</i>	12 closely related <i>Croton</i> spp.	Thailand	Osathanunkul et al., 2015b
<i>ITS</i> , <i>rbcL</i> , <i>trnK</i> - <i>matK</i> , <i>psbA-trnH</i> , <i>trnL-trnF</i>	<i>Calendula officinalis</i> (<i>Asteraceae</i>)	Austria	Schmiderer et al., 2015
<i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC</i> <i>trnL</i>	<i>Thunbergia laurifolia</i> , <i>Crotalaria spectabilis</i>	Thailand	Singtonat and Osathanunkul, 2015
<i>trnH-psbA</i>	<i>Caulis</i> spp. Mutong (<i>Akebia quinata</i>)	China	Hu et al., 2015
<i>ITS2</i>	<i>Artemisia</i> spp.	China	Song et al., 2016
<i>trnL-trnF</i>	<i>Cynanchum wilfordii</i> , <i>Cynanchum auriculatum</i> , <i>Polygonum multiflorum</i>	South Korea	Han et al., 2016
<i>ITS1</i> , <i>matK</i>	<i>Hypericum perforatum</i> , <i>Hypericum androsaemum</i>	Portugal	Costa et al., 2016
<i>ITS</i> , <i>matk</i>	<i>Cudrania tricuspidata</i> Bureau	South Korea	Lee et al., 2017

하여 internal transcribed sequence(*ITS*), tRNA Leu L-F(*trnL-trnF*), ribosomal protein L (*rpl36*), photosystem II thylakoid membrane protein 8 (*psb8*) 단편을 바코드로 하여 HRM 곡선 패턴 분석 기술을 적용한 결과 식물 종에 따라 판별효과가 각각 다르게 나타났다. 예를 들면 *rpl36-psb8* 단편에서 제작한 모든 프라이머 조합은 Crow berry를 다른 종으로부터 구분하기에 충분하였다. 그러나 다른 종은 다른 바코드를 사용하여야 구분이 가능하다고 하였다(Jaakola et al. 2010). 한편, Mader et al. (2011)은 *Veratrum nigrum*와 *Helleborus niger*의 분말제품이 모두 영어로 “Black Hellebore”라고 호칭되어 이들을 구분 유통하기 위한 판별기술을 개발하기 위하여 *matK* 바코드를 사용한 HRM 곡선 패턴 분석기술의 적용결과 성공적이었다고 하였다.

Kim et al. (2013b)은 다양한 *Panax* 종 (*P. notoginseng*, *P. quinquefolius*, *P. ginseng*, *P. japonicus* 등)에 대하여 엽록체계놈의 염기서열을 분석하여 총 101개의 IGS영역을 비교하여 HRM 곡선패턴 분석을 수행한 결과 *trnE-trnT*, *trnT-psbD*,

ndhF-rpl32, *rpl14-rpl16*의 IGS 영역들이 다른 영역들에 비하여 우수한 바코드임을 확인하였다. 그럼에도 불구하고 *P. ginseng*과 *P. japonicus* 사이에는 단일염기다형성을 찾을 수가 없어 HRM 곡선 패턴 분석을 할 수가 없었다고 하였다. 반면에 그리이스와 터키 등에서 허브약으로 상용되고 있는 꿀풀과과(*Lamiaceae*)에 속하는 7종의 *Sideritis*속(*S. scardica*, *S. cladestina*, *S. perfoliata*, *S. syriaca*, *S. euboica*, *S. athoa*, *S. raeseri*)들에 대하여 단 하나의 *ITS2* 바코드를 사용하여 효율적으로 구분이 가능한 HRM 곡선패턴을 찾을 수 있었다고 하였다(Kalivas et al. 2014). Song et al. (2016)의 경우에도 단 하나의 *ITS2* 바코드만을 이용한 HRM 곡선 패턴 분석기술로 국화과(*Asteraceae*)의 *Artemisia*속에 속하는 5종(*A. argyi*, *A. annua*, *A. indica*, *A. lavandulaefolia*, *A. atrovirens*)을 판별하는데 충분하다고 하였다. 이들 약용식물들은 중국의 전통적인 한약재로 그 효능들은 서로 다르지만 형태학적 및 외관상으로 구분하기가 어려워 혼용되고 있는 실정이다. 이와 유사하게 *rbcL*바

코드를 단독으로 사용한 Bar-HAM 분석기술로 Acanthaceae과에 속하는 *Acanthus ebracteatus*, *Andrographis paniculata*, *Rhinacanthus nasutus*의 판별이 가능하였다고 하였으며 (Osathanunkul et al. 2015a), *trnH-psbA* 바코드를 단독으로 사용하여 *Akebia* 허브로 판매되는 *Caulis akebiae*를 다른 위품으로 판매되는 유사 종과의 구분이 가능하였다는 보고도 있다 (Hu et al. 2015). Han et al. (2016)의 경우에도 최근 국내에서 혼용되어 큰 사회적 문제를 야기시킨 바 있었던 백수오 (*Cynanchum wilfordii*)와, 이엽우피소 (*Cynanchum auriculatum*), 그리고 하수오 (*Polygonum multiflorum*) 등 3종에 대한 판별을 위하여 Bar-HRM 기술을 도입하여 본 결과 단 하나의 *trnL-trnF* 바코드만으로도 신속하게 판별할 수 있었다고 하였다.

최근에는 다수의 바코드를 이용한 상호교차 검정을 통하여 보다 정확한 판별을 위한 연구보고가 많아지고 있는 추세이다. Buddhachat et al. (2015)은 여우주머니속 (*Phyllanthus* genus)에 속하는 5종의 약용식물 즉 *P. amarus*, *Phyllanthus urinaria*, *Phyllanthus debilis*, *Phyllanthus airy-shawii*, *Phyllanthus virgatus*를 상호 판별하기 위하여 *rbcL* 과 *trnL* 바코드를 사용하여 HRM 곡선 패턴 분석기술을 적용한 결과 *rbcL*보다 *trnL* 바코드가 단일염기다형성이 골고루 분포되어 있어 보다 우수하였다고 하였다. 또한 Osathanunkul 등 (2015b)은 *matK*, *rbcL1*, *rbcL2*, *rbcL3*, *rpoC*, *trnL*, *ITS1* 등 총 7개 바코드 영역을 사용하여 은어과 (*Euphorbiaceae*)에 속하는 12종의 아주 가까운 근연과계에 있는 *Croton* 종 (*C. caudatus*, *C. crassifolius*, *C. hutchinsonianus*, *C. persimilis*, *C. crassifolius*, *C. hutchinsonianus*, *C. cascarilloides*, *C. hutchinsonianus*, *C. caudatus*, *C. kongensis*, *C. cascarilloides*, *C. crassifolius*)들의 판별을 시도한 결과 *ITS1* 바코드가 가장 우수한 것으로 조사되었으나 *rbcL* 바코드는 오히려 가장 효율성이 낮은 결과를 얻었다고 하였다. 또한 메리골드 (*Calendula officinalis*)의 판별을 위하여 국화과 (*Asteraceae*)에 속하는 10종 (*C. maroccana*, *C. lanzae*, *C. eckerleinii*, *C. meuselii*, *C. officinalis*, *C. arvensis*, *C. incana subsp. microphylla*, *C. stellata*, *C. suffruticosa*, *C. tripterocarpa*)을 대상으로 *ITS*, *rbcL*, *trnK-matK*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF* 등 5종의 바코드를 사용하여 Bar-HRM 분석기술을 적용한 결과 *trnK 5' intron*과 *trnL-trnF* 영역을 사용한 경우에만 *C. officinalis*을 다른 종과 판별이 가능하였다고 보고하였다 (Schmiderer et al. 2015). 뿐만 아니라, Acanthaceae과에 속하는 *Acanthus ebracteatus*, *Andrographis paniculata*, *Rhinacanthus nasutus*, *Thunbergia laurifolia* 등을 판별하기 위하여 *matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnL* 등의 바코드를 사용하여 Bar-HRM 분석기술을 적용한 결과 모든 바코드에서 상호 판별이 가능하였다고 하였다 (Singtonat and Osathanunkul 2015). 또한, 포르투갈에서 *Hypericum* L. (*Hypericaceae*)속에서 속하며 일명 St. John's wort로 호칭되는 전통약재로 쓰이는 *Hypericum perforatum*과 이와는 다른 효능을 나타내지만 역시 전통약재로 인기가 높아 *Hypericum perforatum*보다 비싸게 유통되는 *Hypericum androsaemum*과의 혼용을 방지하고

구분 유통이 가능하도록 하기 위하여 *ITS1*, *matK* 바코드를 사용하여 Bar-HRM 기술을 적용한 결과 우수한 판별효과 보였다고 하였다 (Costa et al. 2016). 그리고 Lee et al. (2017b)의 연구 보고서에 의하면 한국에서 자생하는 꾸지뽕 (*Cudrania tricuspidata* Bureau) 계통과 중국자생 계통간 구분을 위하여 엽록체 *matK*와 핵내 ITS 바코드를 사용하여 역시 Bar-HRM 기술을 적용하여 구분이 가능하였다고 하였다.

이러한 연구결과를 종합하여 보면 현재까지 전 세계적으로 보고된 약용식물의 기원판별을 위하여 개발된 바코드는 엽록체 계통의 경우에는 *matK*, *rbcL1*, *rbcL2*, *rbcL3*, *rpoC*, *trnL*, *trnL-trnF*, *trnK-matK*, *psbA-trnH* 등 다양한 바코드가 사용되었음을 알 수 있었으나 핵 내 바코드는 아직까지 ITS 외에는 보고가 없는 것으로 조사되었다.

전통한약재의 유통질서를 확립하기 위한 Bar-HRM 분석기술의 응용현황

한약재는 유통시장에서 견제품, 분말, 탕약 등을 비롯하여 캡슐, 환, 티백 등 다양한 제품형태로 유통되고 있기 때문에 외관이나 형태학적 특성으로 이들을 구분하기는 거의 불가능하다. 따라서 비교적 안정된 화합물인 DNA 바코드를 이용한 기술로 종의 기원을 판별하는 연구가 도입되기 시작하였다. 특히 Bar-HRM 분석기술은 특정 DNA 바코드의 염기서열을 분석하여 비교하지 않고도 신속하면서 정확도가 뛰어난 것이 특징이다. 그러나 Bar-HRM 분석기술을 실제 한약재 유통시장에서 적용하기 위하여서는 아직 많은 후속연구가 뒤따라야 한다.

따라서 최근, 한국, 중국, 태국, 핀란드, 오스트리아, 그리스 등에서 Bar-HRM 분석기술을 유통시장 현장에서 바로 실용화할 수 있는 기반 구축에 관한 연구결과가 보고되었으며 이들을 종합하여 Table 1과 Table 2에 요약하였다. 아직은 Bar-HRM 기술 분석의 초기 단계에 해당하는 연구로 기존에 정부 공인 인증기관 등을 통하여 마우처 번호를 부여받은 잘 알려진 특정 약용식물 계통을 표준 시료로 하여 순수 DNA를 분리한 다음 그 유용성이 밝혀진 특정 DNA 바코드를 사용하여 HRM 곡선 패턴을 비교분석하여 특정 종의 판별 가능 여부를 확인하고, 다양한 지역에서 수집한 약용식물 계통 또는 유통시장 등에서 원재료를 크게 손상시키지 않은 견제품 등을 대상으로 위품 또는 혼재 등의 여부를 판별하는 연구가 발표되었다.

예를 들면 태국에서 *Croton* (*Euphorbiaceae*)속에서 속하는 많은 종들이 'Plao Noi'라고 하는 동일한 전통약재로 혼용되고 있으나 실제로는 서로 그 효능이 다를 뿐 아니라 특히 일부 종들은 인체에 독성을 나타내거나 염증 또는 괴민성 반응을 나타낼 수도 있는 것으로 알려져 있어 이들을 정확하게 판별이 가능한 분석방법이 시급한 실정이다. 특히 이중에서 *C. stellatopilosus* H. Ohba는 토사광란 등의 복통에 대한 전통 치

Table 2 Application of HRM curve pattern analyses technique for the identification of medicinal plant species

Potential application	Major observation
Rapid identification of the origin for medicinal crops	<ul style="list-style-type: none"> - ITS I barcode was the most useful for the discrimination of 12 <i>Croton</i> spp (Osathanunkul et al. 2015b). - Authentication of 11 collected samples of three different species, <i>Cynanchum wilfordii</i>, <i>Cynanchum auriculatum</i>, and <i>Polygonum multiflorum</i> (Han et al. 2016). - Authentication of Korean-specific ecotypes, <i>Cudrania tricuspidata</i> (Lee et al. 2017).
Practical application with the market products	<ul style="list-style-type: none"> - Authentication of target species in capsule, tea bag, and powdered form (Osathanunkul et al. 2015a Singtonat and Osathanunkul. 2015 Song et al. 2016). - Adulterations of <i>Calendula</i> DNA in saffron could be detected down to 0.01% (Schmiderer et al. 2015). - Authentication of target species commercial herbal infusions (Costa et al. 2016).
Quantitative analysis for detecting of contamination with adulterations	<ul style="list-style-type: none"> - Able to detect a mixture ratio up to 1:200,000. - To quantify a specific target by integrating a second “artificial” target as an internal standard (Mader et al. 2011). - Rapid detection of contamination as low as 1% of other <i>Phyllanthus</i> species in <i>P. amarus</i> admixtures (Buddhachat et al. 2015).

료약재로 사용하고 있으며, 항암 및 항염증 등에도 효능이 있다고 한다. 그러나 적어도 6종의 다른 *Croton*속에 속하는 종들 즉 *C. columnaris* Airy Shaw, *C. delpyi* Gagnep., *C. longissimus* Airy Shaw, *C. kongensis* Gagnep., *C. stellatopilosus*, *C. thorelii* Gagnep. 등도 동일한 전통 약재명으로 혼용되고 있다고 한다. 따라서 Osathanunkul et al. (2015b)은 먼저 GenBank에 등록된 데이터베이스를 통하여 *Euphobiaceae*과에 속하는 *Croton* 종에 대하여 4종의 엽록체 바코드(*matK*, *rbcl*, *rpoC*, *trnL*)와 하나의 핵 내 바코드(*ITS1*)에 대한 염기서열을 비교 분석하였으며 이 과정에서 공인된 식물표본에 의한 바우처 등록번호가 확인되지 않은 것들은 제외하였다. 공인된 시료는 Queen Sirikit Botanic Garden에서 분양받은 것을 사용하였다. 총 5개의 DNA 바코드로부터 7종류의 HRM 분석용 프라이머를 디자인하여 약 200 bp의 크기의 단편이 증폭될 수 있도록 한 후 최종적으로 HRM 곡선 패턴을 비교 분석한 결과 *ITS*바코드에 의하여 이들 종들에 대한 판별이 가장 우수하였다고 하였다.

또한, Han et al. (2016)은 한국의 여러 지역에서 수집한 백수오(*C. wilfordii*), 이엽우피소(*C. auriculatum*), 하수오(*P. multiflorum*) 등 3종에 해당하는 11계통들에 대하여 *trnL-trnF* 바코드를 사용하여 HRM 곡선 패턴 분석기술을 이용하여 이들 계통들을 100% 판별이 가능하였다고 하였다. 특히, 이들 3종에 대하여 염기서열을 비교한 후 상동성이 가장 우수한 부위에서 하나의 프라이머 조합을 제작하여 동시에 3계통을 판별할 수 있도록 하였다. 따라서 향후 시중에 유통되는 이들 한약재를 사용한 제품에서 위품이나 혼재 여부를 판별하는 전략으로 ARMS-PCR 기술에 의하여 1차적으로 판별이 가능하도록 제작한 종 특이 프라이머를 사용하여 먼저 구분을 한 다음 상기한 단 하나의 프라이머 조합을 사용하여 Bar-HRM 분석기

술을 적용하여 최종 확인하도록 전략을 제시하였다.

이와 유사한 연구결과로 꾸지뽕(*C. tricuspidata* Bureau)의 경우에도 한국에서 자생하는 한국토종과 중국에서 자생하는 중국계통을 대상으로 *ITS*와 *matK*바코드의 염기서열을 비교하여 2개에서 3개의 차이가 나는 부위를 포함하여 약 200 bp 내외가 되도록 디자인한 하나의 동일한 프라이머 조합을 사용하여 HRM 곡선 패턴을 비교하여 판별이 가능함을 확인한 후 한국의 다양한 지역에서 수집한 12계통들을 대상으로 적용한 결과 단지 2개 혹은 3개의 염기차이가 나는 두 계통들의 판별이 가능하였다고 하였다(Lee et al. 2017b).

한편, Bar-HRM 분석기술을 실제 현장에 적용하기 위한 응용 연구로 티백, 분말, 캡슐제품으로부터 특정 한약재의 위품 또는 혼용을 확인한 연구결과의 예를 보면 다음과 같다 (Table 2). 최근에 태국의 전통약재 목록(National List of Essentials Medicine, NLEM)에 등재된 3종류의 *Acanthaceae*과에 속하는 *Acanthus ebracteatus* Vahl, *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz에 대한 위품, 혼용 등의 문제점을 해결하기 위한 연구결과가 발표되었다 (Osathanunkul et al. 2015a). 태국에서 이들 3종은 가정에서 여러 가지 질병의 치료에 상시적으로 사용되는 약재들로서 시장에서 유통되고 있으나 이들이 제대로 포장을 하지 않거나 정확한 표식이 없이 판매되며, 특히 도매상의 경우에는 분말상태로 표시가 되지 않은 포장이나 박스로 유통이 된다. 결과적으로 판매상들의 의지 여부와는 상관없이 소비자들은 위품이나 혼재된 제품들을 구입하게 되며, 이들을 제대로 확인 할 방법도 없다. 따라서 이들 3종에 대한 바우처된 샘플을 먼저 태국의 Queen Sirikit Botanic Garden (QSBG)에서 구입한 다음 4종의 DNA 바코드 즉 *matK*, *rbcl*, *rpoC*, *trnL* 에 대

한 염기서열을 비교분석 한 후 약 200 bp 내에 단일염기다형성을 포함하도록 디자인한 프라이머 조합을 사용하여 HRM 곡선 패턴을 비교하여 상호 판별이 가능한 것을 확인 하여 이를 실제 시중에서 구입한 이들 제품에 실용화가 가능한지의 여부를 조사하기 위하여 전통시장으로부터 15점에 해당하는 분말제품들을 구입하였으며 이들은 제품의 정보에 대한 표시가 없거나 제대로 포장되지 않은 상태로 판매되는 것들이었다. 이들 분말시료로부터 채취한 DNA를 사용하여 기존에 확립한 Bar-HRM 분석기술을 적용하여 본 결과 거의 모든 제품이 상기한 3종류가 혼재되어 있음을 확인하였다. 특히 *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees와 *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz는 형태학적으로 아주 유사하기 때문에 일반적으로 채취하는 과정에서도 거의 구분이 잘 안되며 이들을 건조하여 만든 거의 모든 분말 제품에서는 서로 섞여 있다고 한다. 따라서 본 보고서에 의하면 향후 실제 시중에 유통되는 이들 한약제의 구분 유통질서 확립에 큰 도움이 될 것이라고 하였다.

이와 유사한 연구결과로 역시 태국에서 'Rang Chuet' 라는 전통약재로 함께 혼용되고 있는 *Thunbergia laurifolia*과 *Crotalaria spectabilis*를 구분하기 위하여 먼저 바우쳐된 시료를 사용하여 4종의 DNA 바코드(*matK*, *rbcL*, *rpoC*, *trnL*) 사용한 Bar-HRM 분석기술에 의한 판별조건을 확립한 후 시중에서 구입한 건제품, 분말제품, 캡슐, 티백 등 10점의 제품을 대상으로 Bar-HRM 기술을 적용한 결과 10개 제품 중 3개는 이들 두 종이 서로 혼재되어 유통되고 있음을 확인하여 향후 본 기술을 이용하여 유통 질서 확립에 도움이 될 수 있을 것이라고 하였다 (Singtonat and Osathanukul. 2015). 또한 Song et al. (2016)도 국화과(Asteraceae)의 *Artemisia*속 에 속하는 5종 (*A. argyi*, *A. annua*, *A. indica*, *A. lavandulaefolia*, *A. atrovirens*)에 속하는 식물 또는 제품들을 중국의 다양한 지역에서 총 71점의 시료를 수집 (13점은 *Artemisia*속 식물들이었으며, 나머지 58점은 시중에서 유통되고 있는 제품들로서 건제품 또는 분말 등 정확하게 어떤 형태인지 기술되지 않았음) 이들에 대한 기존에 확립된 Bar-HRM 분석기술을 적용하여 본 결과 위품 또는 혼재여부는 확인되지 않았다고 하였다.

한편, Schmiderer et al. (2015)은 메리골드(*Calendula officinalis*)의 saffron(꽃으로 만드는 샛노란 가루로 음식의 색소첨가제로 사용됨)에 혼재되어 있는 다른 *Calendula* 종의 구분이 가능한 Bar-HRM 분석기술을 개발하였다. 특히 saffron에 혼재되어 있는 다른 유사종의 혼입율이 0.01%까지 검출이 가능하다고 하여 향후 이 기술은 탕재, 분말, 티백 등 약용식물의 가공품 뿐만 아니라 다양한 식품 첨가제에 포함된 다른 유사종의 혼입율을 추적하는데 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 Costa et al. (2016)은 포르투갈의 시중에서 *Hypericum perforatum*과 *Hypericum androsaemum*을 우려내거나 달여서 만든 탕재 제품을 대상으로 기존에 바우쳐된 상기 2종에 대한 표준품을 대상으로 확립한 Bar-HRM 분석기술을 적용하여 위품 또는 혼재율을 98.5%이상의 정확도를 갖

고 판별할 수 있었다고 하였다. 포르투갈에서 *Hypericum perforatum*은 St. John's wort라고 불리우는 전통약재로 그리고 *Hypericum androsaemum*는 Hiperição do Gerês로 불리우는 전통약재로 사용되는데 이들은 각각 그 효능과 용도가 다름에도 불구하고 *Hypericum androsaemum*이 *Hypericum perforatum*보다 흔하지 않고 인기가 더 높아 가격이 더 높아서 위품이나 혼용이 심한 실정이라고 한다.

마지막으로 Bar-HRM 분석기술을 적용하여 전통약재를 가공하여 시판되는 제품에 혼입된 특정 종의 혼입율을 보다 정확하게 측정하기 위한 연구결과로 Mader et al.(2011)은 "Black Hellebore"라고 호칭되는 두 종 즉 *Veratrum nigrum*와 *Helleborus niger*의 분말제품을 서로 섞은 후 역시 바우쳐된 표준품을 대상으로 *matK* 바코드로 확립한 Bar-HRM 분석기술을 적용하여 조사한 결과 1:200,000비율로 혼합한 경우에도 검출이 가능하였다. 특히 혼입비율에 대한 HRM 곡선의 패턴이 너무나도 정확하게 비례하였기 때문에 이를 log화하여 직선의 표준 곡선의 제작이 가능하다고 하였다. 또한, Buddhachat 등 (2015)도 태국에서 약용식물들로 제조된 분말 제품이 Look-Tai-Bai 또는 Yah-Tai-Bai 라는 제품명으로 구별이 되지 않고 유통되고 있는 약재의 원료로 사용되는 5종의 여우주머니속(*Phyllanthus* genus)에 속하는, *Phyllanthus urinaria*, *Phyllanthus debilis*, *Phyllanthus airy-shawii*, *Phyllanthus virgatus* 중 *P. amarus*로 만든 캡슐, 타블렛(tablet), 차 등의 형태로 유통되고 있는 6점의 제품을 태국의 지역시장에서 수집하여 역시 기존에 표준 품으로 확립한 Bar-HRM 곡선 패턴 분석기술을 적용한 결과, 모든 제품이 *P. amarus*로 판명되어 위품 또는 오염은 없는 것으로 조사되었다.

향후 해결 되어야 할 과제

Bar-HRM 분석기술의 가장 큰 단점 중의 하나는 미지의 위품의 검출은 한계가 있다는 것이다. 그 이유는 모든 종에 결합하여 반응을 할 수 있는 광역 프라이머 조합을 제작할 수가 없기 때문이다. 그러므로 검출하고자 하는 위품에 대한 프라이머를 기존에 알려진 DNA 바코드를 검색하여 디자인하거나 아니면 분류학적으로 동일한 속 또는 과에 속하는 종의 염기서열 데이터베이스를 근거로 디자인하여야만 한다. 또한 약 200bp 내외의 짧은 단편을 사용하기 때문에 현재까지 알려진 DNA 바코드를 사용한 연구보고서를 종합하여 보면 이렇게 짧은 단편 내에서 상호 판별이 가능한 다수의 단일염기다형성을 찾기가 어렵다는 것이다. 따라서 앞으로 목표로 하는 약용식물과 관련된 유사 종들에 대하여 유용한 DNA 바코드를 보다 많이 확보하여야 할 것이다. 특히 최근에 발전된 Next Generation Sequencing(NGS), Whole Genome Sequencing(WGS) 기술 등의 도입으로 보다 다양한 단일염기다형성을 찾아야 한다. 또한 Sequence Tagged Site marker들을 사용하여 그 응용을 확대하는 연구 또한 필요할 것이다(Kamel et al.

2015).

또 다른 큰 문제는 약용식물이 가공되어 만든 제품 속의 DNA 단편이 분해되어 분리가 안 되는 경우에는 동 기술을 사용할 수 가 없다는 것이다. 대부분의 건제품이나 분말 제품 등은 문제가 없으나 끓는 물을 사용하여 추출하여 제조한 약탕, 잼, 젤리, 주스 등의 제품에서는 일부 DNA가 분해되어 분리가 어렵다는 연구보고서가 있다. 하지만 Bar-HRM 분석 기술은 단지 200 bp 내외의 짧은 DNA 단편만 존재하면 문제가 없으므로 성공할 수 있다고 하겠다. 따라서 보다 많은 가공품을 대상으로 보다 많은 DNA바코드를 사용하면 한약재의 유통시장에서 끊임없이 제기되고 있는 위품 또는 혼용 여부를 판별 할 수 있는 과학적인 기술을 적용할 수가 있을 것으로 전망된다.

적 요

DNA 바코딩 기술은 다양한 약용식물 종들의 기원을 확인하기 위해 폭넓게 이용되고 있는 연구방법이다. 그러나, 시중에 판매되고 있는 유사 식물종을 재료로 사용한 상품이나 혼재되어 있는 상품에서 확인하고자 하는 약용식물을 선별 가능한 실질적인 기술의 개발은 아직 많이 미흡한 실정이다. 최근에는 보다 신속하고 정확도가 높은 기술을 개발하고자 DNA barcoding (Bar) 기술과 high-resolution melting (HRM) curve pattern 분석기술을 혼합한 Bar-HRM 분석기술을 이용한 연구가 진행 중에 있다. 본 리뷰논문에서는 국제적인 시장에서 다양한 기원의 약용식물 판별에 실질적으로 적용 가능한 Bar-HRM 기술의 최근의 발전 과정과 그 이용에 대해서 정리하였다. 다양한 연구들을 통해서 일부 성공적인 결과들이 보고되고 있지만, 제한된 DNA 바코드 및 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 등 아직 해결되어야 할 과제들이 많다. 특히, 핵 내 바코드로는 ribosomal DNA의 internal transcribed sequence (ITS)단편 이외에는 보고된 사례가 한건도 없었다. 또한, 약용식물을 끓는 물로 추출하여 가공한 약탕, 잼, 젤리, 주스 등의 제품은 DNA 단편이 분해되어 분리가 안 되는 경우에는 DNA바코딩 기술을 적용하기가 곤란한 것으로 알려져 있으나 비교적 짧은 DNA단편이 요구되는 Bar-HRM 분석기술을 이용하여 일부 성공한 보고도 있어 향후 그 응용사례가 증가할 것으로 전망된다.

사 사

본 연구는 2017년도 경남과학기술대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Buddhachat K, Osathanunkul M, Madesis P, Chomdej S, Ongchai S (2015) Authenticity analyses of *Phyllanthus amarus* using barcoding coupled with HRM analysis to control its quality for medicinal plant product. *Gene* 573:84-90
- Chase MW, Fay F (2009) Barcoding of plants and fungi. *Science* 325:682-683
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N (2005) Land plants and DNA barcodes: Short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1889-1895
- Chateigner-Boutin AL, Small I (2007) A rapid high-throughput method for the detection and quantification of RNA editing based on high-resolution melting of amplicons. *Nucleic Acids Res* 35: e114
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5:1-8
- Costa J, Campos B, Amaral JS, Nunesc ME, Beatriz M, Oliveira P (2016) HRM analysis targeting *ITS1* and *matK* loci as potential DNA mini-barcodes for the authentication of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* in herbal infusions. *Food Control* 6:105-114
- Er TK, Chang JG. (2012) High-resolution melting: applications in genetic disorders. *Clin Chim Acta* 414:197-201
- Han EH, Cho KM, Goo YM, Kim MB, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2016) Development of molecular markers, based on chloroplast and ribosomal DNA regions, to discriminate three popular medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, and *Polygonum multiflorum*. *Mol Biol Rep* 43:323-332
- Han EH, Lee SJ, Kim MB, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2017) Molecular marker analysis of *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum* using the simple ARMS-PCR method with mismatched primers. *Plant Biotechnol Rep* 11:127-133
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* 270:S96-99
- Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank, (2009) A DNA barcode for land plants. *Pro Natl Acad Sci USA* 106:12794-12797
- Hu J, Zhan ZL, Yuan Y, Huang LQ, Liu Y (2015) HRM identification of Chinese medicinal materials Mutong. *China J Chinese Materia Medica* 40:2304-2308
- Jaakola L, Suokas M, Haggman H (2010) Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. *Food Chem* 123:494-500
- Kalivas A, Ganopoulos J, Xanthopoulou A, Chatzopoulou P, Tsafaris A, Madesis P (2014) DNA barcode ITS2 coupled with high resolution melting (HRM) analysis for taxonomic identification of *Sideritis* species growing in Greece. *Mol Biol Rep* 41:5147-5155

- Kamel KA, Kroc M, Święcicki W (2015) Application of the High Resolution Melting analysis for genetic mapping of Sequence Tagged Site markers in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Acta Biochim Polonica* 62:533–540
- Kim MK, Wang H, Kim YJ, Sathiyamoorthy S, Kwon WS, Yanf DC (2013a) Molecular authentication by multiplex-PCR of three similar medicinal plant species: *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum* and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*). *J Med Plants Res* 7:2584–2589
- Kim JH, Jung JY, Choi HI, Kim NH, Park JY, Lee Y, Yang TJ (2013b) Diversity and evolution of major *Panax* species revealed by scanning the entire chloroplast intergenic spacer sequences. *Genet Resour Crop Evol* 60:413–25
- Kress, WJ, Erickson DL (2008) DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2761–2762
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369–8374.
- Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A (2006) High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAScodon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 6:295–304
- Lee SJ, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2017a) Identification of specific SNP molecular marker from *Cudrania tricuspidata* using DNA sequences of chloroplast *TrnL-F* region. *J Plant Biotechnol* 44:135–141
- Lee SJ, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2017b) Molecular markers based on chloroplast and nuclear ribosomal DNA regions which distinguish Korean-specific ecotypes of the medicinal plant *Cudrania tricuspidata* Bureau. *J Plant Biotechnol* 44:235–242
- Mader E, Ruzicka J, Schmiderer C, Novak J (2011) Quantitative high-resolution melting analysis for detecting adulterations. *Anal Biochem* 409:153–155
- Mishra P, Kumar A, Nagireddy A, Mani DN, Shukla AK, Tiwari R, Sundaresan V (2016) DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotech J* 14:8–21
- Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L (2007) Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols* 2:59–66
- Osathanunkul M, Madesis P, de Boer H (2015a) Bar-HRM for Authentication of plant-based medicines: evaluation of three medicinal products derived from *Acanthaceae* species. *PLoS ONE* DOI:10.1371/ journal.pone.0128476 1–11
- Osathanunkul M, Suwannapoom C, Ounjai S, Rora J, Madesis P, de Boer H (2015b) Refining DNA barcoding coupled high resolution melting for discrimination of 12 closely related *Croton* species. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138888>
- Schmiderer C, Lukas B, Ruzicka J, Novak J (2015) DNA-Based identification of *Calendula officinalis* (Asteraceae). *Appl Plant Sci* 3: 15000691
- Singtonat S, Osathanunkul M (2015) Fast and reliable detection of toxic *Crotalaria spectabilis* Roth. in *Thunbergia laurifolia* Lindl. herbal products using DNA barcoding coupled with HRM analysis. *BMC Complimentary Altern Med* 15:162–170
- Song M, Li J, Xiong C, Liu H, Liang J, (2016) Applying high-resolution melting (HRM) technology to identify five commonly used *Artemisia species*. *Scientific Reports* 6:34133, DOI: 10.1038 /srep34133
- Wojdacz TK, Dobrovic A (2009) Melting curve assays for DNA methylation. *Meth Mol Biol* 507:229–240
- Wu SB, Wirthensohn MG, Hunt P, Gibson JP, Sedgley M (2008) High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *The Appl Genetics* 118:1–4