

발간등록번호

11-1543000-000473-01

작물 육종을 위한 품질분석 지원 사업단
(Molecular and Analytical Service Center
for Quality Improvement of Crops)

서울대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “작물 육종을 위한 품질분석 지원 사업단” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 4월 9일

주관연구 기관명 : 서울대학교
주관연구 책임자 : 고희종

세부연구 책임자 : 고희종
연구 원 : 김홍렬
연구 원 : 최익영
연구 원 : 강문수
연구 원 : 교영이
연구 원 : 최민선
연구 원 : 박일화
연구 원 : 장선미
연구 원 : 고은별
연구 원 : 김백기
연구 원 : 이윤주
연구 원 : 박정현
연구 원 : 이송이

세부연구 기관명 : 서울대학교
세부연구 책임자 : 김정환
연구 원 : 하리라
연구 원 : 박소영
연구 원 : 이혜리
연구 원 : 이강현
연구 원 : 김수연
연구 원 : 김은혜
연구 원 : 나예림
연구 원 : Yu Aili
연구 원 : 문준관
연구 원 : Feng Yanan
연구 원 : 김수희
연구 원 : 황연진
연구 원 : 신용호

세부연구 기관명 : (주)고추와 육종
세부연구 책임자 : 윤재복
연구 원 : 도재왕
연구 원 : 이원필
연구 원 : 이준대
연구 원 : 박석진
연구 원 : 최미숙
연구 원 : 최화춘
연구 원 : 홍수철
연구 원 : 박인경

세부연구 기관명 : 서울대학교
세부연구 책임자 : 양태진
연구 원 : 이석하
연구 원 : 서학수
연구 원 : 이상춘
연구 원 : 박지영
연구 원 : 최홍일
연구 원 : 김준하
연구 원 : 이윤선
연구 원 : 김남훈
연구 원 : 이종훈
연구 원 : 박현승
연구 원 : 정주연
연구 원 : 김경희
연구 원 : 이서희
연구 원 : 이현오
연구 원 : 문진아
연구 원 : 김연정
연구 원 : 최순호
연구 원 : 한윤정
연구 원 : 김성일
연구 원 : 장영은
연구 원 : 손수려

연구 원 : 윤민영
연구 원 : 김길현
연구 원 : 한광수
연구 원 : 장경희
연구 원 : 장그린
연구 원 : 황원주
연구 원 : 심상래
연구 원 : 하수연

세부연구 기관명 : 건국대학교
세부연구 책임자 : 이주현
연구 원 : 황 성
연구 원 : 이원도
연구 원 : 김희진

세부연구 기관명 : 파트너종묘
세부연구 책임자 : 김용재
연구 원 : 김용권
연구 원 : 강순철
연구 원 : 박건화
연구 원 : 이순희
연구 원 : 박부남
연구 원 : 권세승
연구 원 : 조상오
연구 원 : 이강조
연구 원 : 성백양
연구 원 : 유영섭
연구 원 : 김치호
연구 원 : 이승분
연구 원 : 연은하
연구 원 : 이광진
연구 원 : 광량숙
연구 원 : 오상록

요 약 문

I. 제 목 : 작물 육종을 위한 품질분석 지원 사업단

II. 연구개발의 필요성 및 목적

1. 연구의 필요성

- 국민소득 중대와 건강한 식습관에 대한 관심이 높아지면서 고기능성, 고품질의 작물에 대한 수요가 증가하고 있어서, 다양한 기능성 물질들에 대한 분석연구가 필요하고, 새로운 고품질 신품종 육성이 요구되고 있다. 이는 또한 세계적인 추세이므로 고품질 육종이 종자산업의 국가 경쟁력을 키워주는 지름길이 될 수 있다.
- 이러한 상황 가운데 작물 유전체 연구의 성과와 분자유종기술의 발달에 기인하여 미국 등 선진국에서는 분자마커기술을 활용한 분자유종 체계를 구축하고 있다. 또한 주요 다국적 기업은 주요 작물에 대한 분자마커 개발 및 대량분석 시스템을 완비하고 있다.
- 그러나 국내의 분자마커의 개발 및 육종에의 적용은 이제 시작단계로 분자마커 분석 서비스의 지원이 절대적으로 필요한 상황이다.
- 또한 기능성 물질들에 대한 분석 분야에 있어서도 기능성/생리활성 생화학 성분에 대한 분석 지원 서비스를 전문적으로 수행하는 기관이 없거나 고가의 분석 비용 때문에 품질 육종 연구를 뒷받침 하는데 어려움이 따르고 있다. 덧붙여 기존 품종 중에서도 생리활성을 인정받은 기능성/생리활성 생화학 성분을 정밀하게 분석하기 위한 분석기술이 필요하다.
- 즉 주요작물의 성분 분석 및 분자유종기술 지원을 위해서는 지속적으로 각 작물의 유용형질에 대한 분석지원 기술을 개발하여야 하며 체계적인 지원체계가 갖추어져야 한다.
- 따라서 본 사업단은 주요작물의 육종 효율증진을 위해 지속적으로 분석 기술(분자 마커 및 성분 분석 기술)을 개발·개량 하고 또한 지원서비스를 저가로 수행하는 체계적인 지원 시스템을 갖추고자 하였다.

2. 연구 개발 목적

- 작물의 고품질 육종을 위해 분자마커를 개발하고 지원 서비스를 실시한다.
- 사업단의 분자마커 연구 분야는 주요 작물인 벼, 고추, 배추 및 인삼, 수박에 중점을 두고 품질 관련, 병 저항성 관련, 국제 경쟁력 강화 관련 유전자에 관심을 갖고 분자 마커를 개발한다.

- 작물의 품질 육종을 위한 기능성/생리활성 생화학 성분에 대한 정밀 분석 기술을 확립한다. 일반적인 단일성분 분석법 뿐 만 아니라, 가능하면 다성분 동시 분석기술을 확립하여 타 분석 기관과 차별화된 분석 기술을 개발하고, 확립된 정밀 분석 기술을 활용하여 다양한 작물의 기능성/생리활성 생화학 성분에 대하여 분석 서비스를 제공한다.
- 분자마커 활용 육종법에 관한 민간육종가 대상 교육 프로그램을 진행하여 분자 육종 저변을 확대한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

연구 개발 내용	연구 범위
1. 작물 품질육종을 위한 분자마커 개발 검증 및 지원 서비스	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼 식미 및 품질 관련 유전자 발굴과 분자마커 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 당질배유, 전분 합성 관련 유전자 및 분자마커 연구 - 식미 판별 마커 추가 개발 및 개량 - 벼 단백질 함량 관련 유전자 및 분자마커 연구 ○ 작물 분자마커 서비스 20,000점 이상 지원 ○ 연도별 분자마커 활용 워크샵 개최
2. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발 및 지원 서비스	<ul style="list-style-type: none"> ○ 쌀, 현미, 유색미 등의 곡류에서 미량 생리활성물질인 GABA 등의 미량 분석 기술 확립 ○ 콩 등으로부터 항산화물질 isoflavone, anthocyanin 신속, 간편 분석법 개발 ○ 배추와 고추 등의 엽채류 채소의 기능성 성분 (glucosinolates, 당류) 분석법 확립 ○ 포도의 항암/항산화 성분인 resveratrol과 유기산 성분의 분석기술 개발 ○ 인삼, 가시오가피 등의 특작류의 기능성물질(ginsenosides, eleutherosides) 분석기술 개선 ○ 생화학 성분 분석 서비스 5,000점 지원 ○ 민간육종가의 요구에 의한 기능성 생화학 성분 분석 기술 추가 개발
3. 고추에서 분자마커 분석 서비스 지원 및 TMV 저항성 L 유전자좌와 매운맛 함량 조절유전자 연관 마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고추 분자마커 분석 서비스 55,000점 이상 수행 ○ 고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자(L^1, L^2, L^3, L^4)를 모두 구분할 수 있는 분자마커 세트 개발 및 실용화 ○ 고추 분자표지 multiplexing 기술 개발 ○ 고추 매운맛 함량 조절유전자와 연관된 분자마커 개발 및 실용화
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고려인삼 품종구분 마커 개발 및 실용화

연구 개발 내용	연구 범위
4. 약용 및 식량작물의 고품질 육종 분자표지 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고려인삼 품종구분 마커를 이용한 인삼 육종 및 종자보급체계 지원 ○ 인삼 근연종 약용작물의 마커 개발 (오가과, 산형과 근연종 구별을 위한 마커 개발) ○ 벼 종자 미량단백질 프로파일링화 ○ 배추 베타카로틴 생합성 관련 분자마커 개발 및 기능성 중소구형 배추 품종 육성 ○ 콩 종실 phytate함량 관련 마커 개발 및 적용
5. omics 기술을 활용한 배추 환경내성 마커 개발 및 유전자 동정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지부 배추 내건성 마커 개발 및 유전자 동정 ○ 지부 배추 고온저항성 마커 개발 및 유전자 동정
6. 수박 고탐량 라이코핀 분자마커 개발 및 이를 이용한 수박 품종개발 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고탐량 라이코핀 유전자원 규명 ○ 라이코핀 함량 분석을 통한 고탐량 라이코핀 계통 및 품종개발 ○ 효율적인 품종개발을 위한 해외 세대 진전 체계 확립 ○ 고탐량 라이코핀 관련 분자마커개발 ○ 분자마커와 열대세대진전을 활용한 효율적인 품종 개발 시스템 구축

IV. 연구개발 결과

결과 요약	비고
<ol style="list-style-type: none"> 1. sugary-2 (su2) 유전자 발굴 및 기능 확인 2. 고식미 품종 특이적 염기서열 및 염색체상의 위치 확인 3. staygreen 돌연변이체의 작물학적 특성 조사 및 계통 육성 4. 자포니카, 인디카 벼의 식미 마커 추가 개발(개발) 5. 다수성 관련 <i>dep3</i> 유전자 지도 작성 및 분리 6. 벼 전분 생합성 관여 <i>RSUS3</i> 유전자의 SNP와 haplotype 다양성 확인 7. 분자마커 지원서비스: 7개 기관에 22,682점의 분자 마커 분석 지원 8. 분자마커 활용 워크숍 5회 진행, 100여명 수료 	제1-1 세부
<ol style="list-style-type: none"> 1. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) 현미, 유색미 등 곡류의 GABA 분석법 확립 2) 콩 등에서 isoflavone (7종) 동시분석법 확립 3) 베리류의 anthocyanin (7종) 동시분석법 확립 4) 십자화과 식물의 glucosinolates (11종) 동시분석법 확립 	제1-2 세부

결과 요약	비고
<p>5) 과일 등의 당류 (5종) 동시 분석법 확립</p> <p>6) 포도의 resveratrol 분석법 확립</p> <p>7) 과일 등의 유기산 성분 (7종) 동시분석법 확립</p> <p>8) 인삼의 ginsenosides (15종) 동시분석법 확립</p> <p>9) 가시오가피의 eleutherosides (2종) 동시분석법 확립</p> <p>2. 민간육종가의 요구에 의한 기능성 생화학 성분 분석 기술 추가 개발</p> <p>1) 수박, 멜론 등에서 lycopene, β-carotene (2종) 동시 분석법 확립</p> <p>2) 고추의 capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate (4종) 동시 분석법 확립</p> <p>3) 파프리카에서 apigenin-7-glucoside 분석법 확립</p> <p>4) 양파의 quercetin 성분 분석법 확립</p> <p>5) 쌀 등 곡류의 아미노산 (28종) 동시분석법 확립</p> <p>3. 생화학 성분 분석 지원 서비스</p> <p>: 5년 동안 민간육종가, 대학, 공기업 등 20개 기관에 24개 작물에 대한 기능성 성분 21종을 서비스하여 총 7,441점의 분석 서비스를 지원함</p> <p>4. 분석법 표준화 SOP(Standard Operating Procedures) 마련</p> <p>: 작물 품질 육종을 위한 다양한 생화학 성분 분석 기술을 확립하고 확립된 분석법의 표준작업지침(SOP)을 마련함</p>	
<p>1. 고추 분자마커 분석 서비스 76,613점 수행</p> <p>: 고추의 형질 연관 마커(용성불임성, 병 저항성 및 매운맛 등 20여 가지)를 18개 국내외 종자회사 대상으로 마커분석 지원 서비스를 수행. 매년 목표량을 상회하여 최종 목표량(55,000점) 대비 39.2%(21,613 점)를 초과달성.</p> <p>2. L 대립유전자 구별 분자마커 세트 개발 및 실용화</p> <p>: 고추 TMV 이병성(L^+) 및 저항성 대립유전자(L^1, L^2, L^3, L^4) 특이적인 분자마커 개발. 상용고추 53종의 L 유전형 조사 및 외부 분석을 통해 L 연관 마커를 실용화함.</p> <p>3. 고추 분자표지 multiplexing 기술 개발</p> <p>: 분석 서비스 비용을 절감하고자 수요가 많았던 마커를 중심 multiplexing 기술 도입을 시도함. 조사한 15개 조합 가운데 PR-CAPS와 M3-CAPS 조합만이 multiplex용으로 적합한 것으로 판명됨.</p>	제1-3 세부

결과 요약	비고
<p>4. 기 개발된 고추 마커를 HRM 마커로 전환 : multiplexing 기술의 적용 효율이 낮아 분석 속도 향상이 가능한 HRM 마커 개발로 목표를 수정. Rf, 역병, msk, CMV 저항성 분석용 STS 마커를 HRM 마커를 개발함. 기존 STS 마커와 함께 분리됨을 확인하고 이후 분석서비스에 활용함.</p> <p>5. 고추 매운맛 함량 조절유전자와 연관된 분자마커 개발 및 실용화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신미 함량과 관련된 다양한 소재를 탐색하던 중 신미 함량을 낮추는 계통 (135BG)을 발견. 유전분석을 수행한 결과 주동 단일 우성 유전자가 존재하는 것으로 확인됨. 집단 육성 및 BSA-AFLP를 수행. 다형성 보인 후보조합 가운데 일부를 STS 또는 SNP(HRM) 분자표지로 전환함. 이들 가운데 주동 유전자와 연관된 167908-2-CAPS 마커를 개발하였으나, 보다 가까운 마커 개발 위해 QTL mapping 수행하여 주동 유전자를 포함한 minor QTL과 연관된 분자표지 찾음. - Pun1 유전자가 없는데 교배시 매운맛 함량을 높이는 계통 HP1을 2년간 두 개 집단에서 유전분석한 결과 HP1이 잠재적으로 매운맛을 높게 만드는 우성유전자를 가지고 있으나 매운맛은 양적으로 유전함을 확인. 	
<p>1. 고려인삼 품종구분 마커 개발 및 실용화</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 발현 유전자 유래 SSR 프라이머 123쌍 개발 및 22개의 국내인삼 내 차이를 보이는 마커 개발 2) 발현유전자 유래 마커 기능 검색하여 대사 관련 마커 37개 확인 3) 발현 유전자 서열 유래 SNP 탐색 및 90개의 dCAPS 프라이머 개발 4) 발현 유전자 유래 SSR-HRM 마커 6개 개발 5) RAPD 프라이머 700쌍을 이용한 마커 조사 6) 천풍, 연풍 간 다형성을 보이는 23쌍의 유전체 서열 기반 SSR 마커 개발 7) 고려인삼 모든 상용품종인 9품종 구별을 위한 마커조합 개발 <p>2. 고려인삼 품종구분 마커를 이용한 인삼 육종 및 종자보급체계 지원</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) SSR-HRM 마커를 이용해 658개의 천풍 품종 순도 검정 2) 품종구분용 마커를 이용한 1576점의 실용적 분석 서비스 지원 <p>3. 엽록체 염기서열 분석을 이용한 인삼 및 근연종 마커 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 등록된 9품종의 엽록체 염기서열 완성 및 변이지역 확인 2) 고려인삼, 미국삼, 중국삼 구별 가능한 마커 개발 3) 오가과, 산형과 근연종 구별을 위한 후보 마커 개발 <p>4. 품종구분 마커를 이용한 인삼 가공 제품 내 기원 판별 확인</p>	<p>제2-1 세부</p>

결과 요약	비고
<p>5. 벼 종자 미량단백질 프로파일링화</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 형질전환체 생산, western blot, ELISA 방법 이용하여 항체 생산 2) Protein Disulfide Isomerase (PDI) Binding protein (BIP), Rice Endosperm bZIP (REB) 단백질을 코딩하는 유전자가 파괴된 돌연변이체를 real time RT-PCR과 western blot 방법을 이용해서 선발 3) 각각 PDI, BIP, REB 단백질에 의해서 함량이 조절되는 단백질 동정 4) 단백질체학을 통한 고식미 또는 저식미 특이적 단백질 동정 <p>6. 배추 베타카로틴 생합성 관련 분자마커 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 오렌지 내엽색 및 prolycopene 고함량 배추 판별용 분자 마커 3종 개발 2) 분자 마커를 이용한 배추 계통간 변이 탐색 및 육종 시스템 구축 <p>7. 콩 종실 phytate함량 유전자원 수집 및 유전집단 양성</p>	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 배추 유묘 단백질체 3,009 단백질 동정. 동정된 단백질들은 pI value 가 5~7 사이의 단백질이 가장 많았고, 8 이상의 단백질도 50% 이상 동정되었는데, 이는 기존의 2D - PAGE 연구 기술에서 동정하기 힘든 단백질로, 본 연구진의 shotgun proteomics 분석에서 대량의 basic 배추 단백질들이 동정되었음. 2. 배추 건조 스트레스 반응 단백질체 발현량 조사. 건조자극에 반응하여 단백질체의 발현 변화 양상을 조사하여, heat shock protein, pigment biosynthetic process, transcription factor 등의 단백질들이 특이 반응 하는 것을 확인하였고, 이들 단백질의 건조저항성 관여 가능성을 제시함. 3. 내건성관여 후보 단백질(유전자) 정보 제공. Bra008737 Bra034402 Bra036764, Bra017055 Bra000144 Bra005019 유전자의 건조 저항성 후보유전자로 선발하였으며 이중 Bra008737 정보를 벼 과발현 형질전환체 육성 연구에 제공함. 	제2-2 세부
<ol style="list-style-type: none"> 1. DRD 계통 및 Dixielee에서 라이코펜 함량 측정을 통해 고함량 라이코펜 수박 유전자원을 규명함. 2. 라이코펜 함량분석 및 육종을 통하여 DRDSBA 등 많은 수의 고함량 라이코펜 관련 수박 계통을 개발하였음. 3. 라이코펜 함량이 높고 품질이 우수한 리코스위트 1호, 리코스위트 2호, 리코후레쉬 1호, 리코후레쉬 2호 수박을 개발하였고 품종보호 출원함. 4. 리코스위트 1호에 대한 품종보호등록(제4887호) 5. 리코후레쉬 2호 베트남 수출(2013. 8. 31) US\$3,000 달성 	제2-3 세부

결과 요약	비고
6. 태국에서 건기, 여름, 우기 작형에서 안정적인 수박 세대 진전 체계 수립 7. 수박 고품량 라이코핀 분자마커개발을 위한 4세트의 NILs 개발 8. RAPD, AFLP, SRAP 분석을 통하여 총 32개의 예비마커 중에서 11개의 마커가 2개의 계통에서 polymorphim을 보이는 것을 확인함. 9. Candidate gene search를 통해 라이코핀 생합성과 연관 있는 21쌍의 분자마커를 설계함. 10. 보다 근접하고 확실한 분자마커개발을 위하여 고품량 라이코핀 NIL인 SBA, DRDSBA, 45NC, DRD45NC 그리고 고품량 라이코핀 유전자원인 DRD의 resequencing을 추진 중임. 11. MAS + 세대진전을 활용하여 24개월 안의 품종개발시스템, MAS+ MAB + 세대진전을 활용한 16개월 안의 품종개발시스템이 제안됨.	

V. 연구 성과 및 성과 활용 계획

5년간의 본 연구 사업단을 통하여 분자마커의 경우 25개 기관에 99,295점을, 성분 분석은 20개 기관에 7,441점을 지원 서비스하였다. 본 사업단의 지원서비스로 인하여 다양한 작물의 육종 효율이 증대되었고 대외 경쟁력도 향상되었을 것으로 판단된다. 또한 개발 분야에서는 분자마커 10종 188점을 개발하고, 92종 성분에 대한 분석 기술 확립하였으며, 일부는 지원서비스에 곧바로 이용하기도 하였다. 또한 지원사업단으로써 5회의 분자마커 활용 워크숍 교육 프로그램을 통해 민간 육종 연구자들의 분자 육종에 대한 이해도를 향상시켜 분자 육종의 저변을 확대하였으며, 교육 교재로 제작된 7권의 이론 및 실습 관련 책자와 표준 분석법(SOP)은 분자육종 지원사업단의 매뉴얼로서 소중한 자료로 남았다.

개발 분야에서 먼저, 성분 분석법은 단일 성분뿐만 아니라 다성분 동시 분석기술에 초점을 맞추어 신속하게 많은 성분을 저비용으로 분석 할 수 있게 되었다. 고추 매운맛 성분 4종, 수박의 카로티노이드 2종, 베리류의 안토시아닌 7종, 아미노산 28종, 인삼의 진세노사이드 15종, 배추의 글루코시놀레이트 11종 동시분석 등이 그 대표적인 예로써 모두 우리나라 주요 작물의 기능성 성분들이다. 벼의 분자 마커 개발에서는 식미 분석 분자마커 세트를 더욱 발전시키고 추가 개발하여 자포니카 및 인디카 벼에서 식미를 예측할 수 있게 되었으며, 관련 유전자들을 규명하였다. 고추는 TMV저항성 구별 마커를 개발하여 상용하였고, 고추의 주요 분자 마커들(역병 구분, 옹성불임 등)을 개량하여 좀 더 빠르고 쉽게 검정 서비스를 제공할 수 있게 하였다. 또한 매운맛을 구분할 수 있는 분자마커 개발에 있어서도 상당한 진전을 보였다. 우리나라 대표 작물 중의 하나인 인삼에 관한 연구에서는 인삼품종구분 마커, 우리삼(고려인삼) 판별 마커, 인삼가공제품의 원료 삼 판별마커 등을 개발하고 실용화 하여 우리삼의 브랜드 가치를 분명히 하고 국가 경쟁력을 높여 주는데 기여하게 되었다. 또한 배추에 있어서는 내염 색깔을 판별하는 마커를 개발하였으며 기능성 배추 육종에 사용하고 있다. 온난화 기후 변화에도 관심을 두고 최신 proteomics 기법을 통해 배추의 고온 저항성 및 건조 저항성 관련 유전자를 거의

찾았으며 분자마커로도 개발된 예정이다. 수박연구에 있어서는 고품량 라이코핀 기능성 수박
신품종 4개를 개발하였고 이를 상품화 하고 베트남에 종자 수출도 하였다. 고품량 라이코핀 수
박 분자마커 개발도 곧 완료될 것이다. 그리고 태국에 고품가가치 수박 연구를 위한 세대진전,
시교생산 및 열대지방의 수출용 육성기지로써의 연구 거점(시험포 등)을 확보하였다.

연구 개발 결과들은 특허(출원5건, 등록3건) 및 논문(12편)으로 지식재산권을 확보하였고, 국
내외 학술대회에서 구두와 포스터로 그 결과가 발표 되었다(39건). 개발된 품종들도 품종 보호
출원(4건), 품종보호 등록(2건), 품종 명칭 등록(4건)을 실시하였다. 개발된 수박 신품종 4가지
는 이미 사업화, 상품화 하였고 추후에는 이 신품종들에 대한 종자를 계속해서 수출할 계획이
다.

지원사업단으로써 분자 마커에 대한 학술행사를 주최(5회)하기도 하였으며 지원서비스 전문
인력 및 석·박사 졸업생 등 11명의 인력을 양성하였다. 교육 프로그램 시 제작한 7권의 교재는
향후 기술 전수에 사용될 수 있다. 또한 성분분석에 관한 표준 분석법도 체계화 하여 본 보고
서에 실려 있으며 이 역시 향후 지원서비스 및 기술 전수에 효과적으로 사용될 것으로 보인다.

또한 본 사업을 통해 확보한 태국의 육종 연구 거점을 활용하면 보다 효율적인 계통육성 및
품종개발이 가능하여 고품가가치 품종 종자의 내수 및 수출 시장 확대에 기여할 것으로 예상
된다.

이미 개발된 또 개발될 분자 마커 및 성분 분석 기법들은 또 다른 연구 개발 사업에 연계되
어 계속되어져 그 가치가 입증될 것이며, 논문 및 특허로 지식재산권을 확보하고 유·무상으로
기술이전 하여 종자산업진흥센터에서 사용 될 수 있게 할 것이다.

국내에서 육종 기술 측면에서 민간에 지원 서비스를 실행한 최초의 시스템으로서의 본 사업
단의 유·무형의 기술력 및 노하우와 경험은 농업기술 실용화재단의 “민간육종연구단지 육종지
원서비스 구축 및 운영 방안” 보고서를 통해 많은 부분이 전수 되었고 앞으로도 종자산업진흥
센터 분자마커 및 성분분석 육종지원서비스에 도움을 줄 것으로 보인다. 종자산업진흥센터의
지원서비스 안정화 시점까지는 대학 내 연구소에 서비스 지원팀을 구축하여 서비스를 지속할
수 있는 방안을 마련할 계획이다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title : Molecular and Analytical Service Center for Quality Improvement of Crops

II. The purpose and Contents

Demand of functionality and high-quality crops has been increasing all over the world. To meet the global market trend, breeding programs for high-quality crops have been launched. However, there has not been proper infrastructure, such as supporting systems or service centers for molecular marker analysis and functional/bioactive biochemical analysis, to promote those breeding programs particularly in small-sized seed companies. In this regard, this project aimed to set the systematic supporting systems that can develop analytical methods consistently and provide analysis services to improve breeding efficiency. It is a task of great significance to supply low cost and customized analysis services from governmental leading projects.

This project is divided six sub-topics. Those are 1) development and improvement of molecular markers and services for crop breeding, 2) analytical service and analytical method development of biochemicals for crop breeding, 3) molecular marker analysis service and development of markers linked to the *L* locus and the capsaicinoids content in pepper, 4) development of molecular markers to assist breeding of main agricultural crops, 5) developing DNA markers and identifying genes for resistance to abiotic stress in brassica napa by omics technology, 6) development of high lycopene related marker and variety development system in watermelon.

III. Results summary of this research project

1. We serviced molecular marker analysis, 99,295 samples, and biochemical analysis, 7,441 samples to 40 seed companies and other breeding institutes for last 5 years. In addition, we developed 10 types of 188 molecular markers and established 92 biochemical analysis methods. Those developed markers and methods used in analysis services directly. As a support project group, we also held the education program workshop every year to improve understanding about molecular breeding and those workshops contributed to expand the base of individual molecular breeding. We made 7 text books for education workshops, these books are valuable references with standard analysis method of

biochemicals as a manual of our project group.

2. The main result of the development area is summarized as follows.

In part of 'Rice marker development', we developed the *japonica* marker set for eating quality evaluation and added *indica* marker set. Thus, it became possible to evaluate of eating quality in both cultivated rice, and related genes were elucidated.

Analytical methods were established for functional/bioactive biochemicals which other analytical institute does not offer related analytical service. The better analytical technology was developed by establishing of multi-compound analytical methods being different from other analytical institute and analytical service was offered for many functional/bioactive biochemicals using the established analytical methods. We developed and established 92 biochemicals analysis method for 5 years. Low cost analytical services were offered for many functional/bioactive biochemicals to contribute to the establishment and activation of crop quality breeding research bases of industry/academia/government/research institute/private sectors. The established analytical technology and Know-How could be utilized for high technology plant metabolomics research in crop physiology/breeding area.

A marker set for differentiating *L* alleles (L^+ , L^1 , L^2 , L^3 , and L^4) was successfully developed and applied to screen TMV resistance in 53 commercial F_1 hybrids and the samples breeders have. In order to reduce the cost and improve marker analysis service, a multiplexing marker (PR-CAPS and M3-CAPS) and four HRM markers were also developed and applied to test Rf, msk, a major QTL of root rot disease, and cucumber mosaic virus resistance. Genetic study showed that a decreased pungency was controlled by a major QTL (LP gene) which was located on the pepper chromosome 12 with minor QTL. Some markers were linked to the LP gene and minor QTL. High pungency was quantitatively controlled by one major and other QTLs.

we developed DNA makers of Korean ginseng and marker combination set for cultivar authentication. Using NGS technology, we completed the chloroplast genomes and rDNA sequences of nine *Panax* ginseng cultivars and *Panax*-related medicinal crops. After comparative analysis of these chloroplast genomes, we developed cultivar-specific and species-specific DNA markers based on sequence variation. We also established DNA extraction method from ginseng commercial products, and we investigated several products with developed markers. It can be used in pure line selection, F_1 hybrid test and selection of off-type, so we expected that it will promote ginseng breeding and seed industry.

Carotenoids are color pigments that are important for protection against excess light in plants and essential sources of retinols and vitamin A for animals. We investigated carotenoid contents and responsible gene of *Brassica rapa* with orange-colored (OC) inner leaves. OC phenotype was controlled by a single recessive gene, *BrCRTIS01*, and

OC cultivar were enriched in lycopene-like compounds. Genomic sequence analysis revealed that *BrCRTISO1* of the OC cultivar had many sequence variations, such as SNPs and InDels, compared to that of the YE cultivar. We developed three molecular makers based on the polymorphic regions within *BrCRTISO1* and applied those for the identification of OC phenotype in *B. rapa* breeding.

The advantage of proteomic study is to provide the global snapshot inside of plant cell, which can be used to screen the useful proteins against various stress. In this research project, drought stress were treated to napa cabbage and then the proteome expression pattern were monitored from the 0 hour time point, 24 hours after heat treatment, and 48 hours after heat treatment. By merging all of the analyzed samples, we identified 3,009 non redundant proteins in the shoot of 3 week old napa cabbage, which is the deepest protein identification in the napa cabbage proteome studies. By comparing proteome expression levels during drought stress, specifically expressed 440 proteins were detected. From the clustering and GO analysis, we provide candidate proteins for the resistance of drought stress such as annexin, transcription factor, and heat shock proteins.

We identified 2 high lycopene watermelon germplasms, such as DRD and Dixielee, develop many high lycopene inbred lines and hybrids including 4 commercial hybrids. Among commercial hybrids, one hybrids gains Plant Variety Protection right by the Korean government and commercial seeds of Lycosweet No.2 began to export to foreign countries such as Vietnam. We also develop very useful population and NILs have been used to develop molecular markers related high lycopene trait. Through 4 years trials in Thailand, very efficient and stable shuttle breeding systems was set-up and this system will be integrated with MAS/MAB system for efficient and fast breeding system.

IV. Plans for the application of outputs

The research results were used for the intellectual property right security by patents(5 apply, 3 obtain), paper(12) and oral/poster presentation at conference(39). Developed cultivars were registered as plant variety protection(4 apply, 2 obtain) and variety name(4). Newly developed watermelon cultivars were already commercialized and planed for seed export.

As a supported service center, the education program for molecular marker was held (5 times) and 11 people who gained high technique for supported service and graduated master/doctoral course were trained. Seven textbooks which made for educational program can be used for future instruction. Standard method for biochemical analysis is in this report, and also can be used for future service and technique instruction.

Breeding research base in Thailand established through this project will be aid for expansion of export markets as well as demand of high value seed by efficient pedigree

improvement and cultivar development.

Developed and developing molecular markers and biochemical analysis methods will be valuable for future research project. These results will be used as paper publications and patents for the intellectual property right, and be used for breeding support center in Seed valley by profit or non-profit technology transfer.

As the initial system for breeding support service, our techniques and know-how were transferred through the report of 'Ministry of agriculture, food and rural affairs', and these will help to molecular marker and biochemical analysis service in Seed valley. Until the service of Seed valley become stable, service support team which established in university research center will plan for the service duration.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Review of the research progress	22
Chapter 3. Result and Outcome of Research and Development	32
Sec.1. Development and Improvement of Molecular Markers and Services for Crop Breeding	32
Sec.2. Analytical service and analytical method development of biochemicals for crop breeding	70
Sec.3. Molecular marker analysis service and development of markers linked to the <i>L</i> locus and the capsaicinoids content in pepper	293
Sec.4. Development of molecular markers to assist breeding of main agricultural crops	318
Sec.5. Developing DNA markers and identifying genes for resistance to abiotic stress in brassica napa by Omics technology	406
Sec.6. Development of high lycopene related marker and variety development system in watermelon	420
Chapter 4. Achievements and contribution to related fields	493
Chapter 5. Future Application of the Achievement	498
Chapter 6. Information obtained during implementation of the project	526
Chapter 7. Status of Research Facilities and Equipments	527
Chapter 8. References	527

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	22
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	32
제1절(제1-1세부과제) 작물 품질육종을 위한 분자마커 개발 검증 및 지원 서비스	32
제2절(제1-2세부과제) 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발 및 지원 서비스	70
제3절(제1-3세부과제) 고추에서 분자마커 분석 서비스 지원 및 TMV 저항성 <i>L</i> 유전자좌와 매운맛 함량 조절유전자 연관 마커 개발	293
제4절(제2-1세부과제) 약용 및 식량작물의 고품질 육종 분자표지 개발	318
제5절(제2-2세부과제) omics 기술을 활용한 배추 환경내성 마커 개발 및 유전자 동정	406
제6절(제2-3세부과제) 수박 고품량 라이코핀 분자마커 개발 및 이를 이용한 수박 품종개발 시스템 구축	420
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	493
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	498
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	526
제 7 장 연구시설 · 장비 현황	527
제 8 장 참고문헌	527
별 첨	539

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성

가. 작물 품질육종을 위한 분자마커 개발 검증 및 지원 서비스

- (1) 쌀의 경쟁력을 결정하는 것은 식미이고, 이제까지 연구된 바로 양식미 품종이 갖추어야 할 조건은 낮은 호화온도, 저단백, 저아밀로스, 저응집 및 치반 점도, 아밀로펙틴 단쇄비율 향상, 구수한 냄새, 투명한 외관, 얇은 겨층 등으로 요약되며, 이러한 이화학적 선발지표에 의해 지금까지 양식미 육종이 이루어져 왔다. 그러나 종래의 선발육종으로는 식미향상에 일정한 한계가 있어 분자육종에로의 전환이 요망되지만 분자육종을 위한 선발표지, 식미 관여 유전자 등에 관한 연구가 매우 미흡하다.
- (2) 더욱이 우리나라의 고품질(양식미) 육종은 종래의 교배 및 선발 육종에 한정되어 있어서 품질을 진일보 시키는 데에는 한계가 있으며 기초연구가 대단히 미흡하다. 특히 게놈해석 시대에 있어서 품질과 식미를 지배하는 유전자에 대한 연구는 거의 이루어지지 못하고 있다. 우리쌀의 경쟁력 유지가 지극히 우려되는 시점에서 경쟁국들의 품질향상을 위한 기초연구 강화 노력을 좌시할 수 없으며 우리도 시급히 기초연구와 분자육종을 추진하여야 한다.
- (3) 품질(식미)을 유전자 수준에서 해석함으로써 유전자 변이를 활용하여 품질을 고급화하고, 선발 지표를 개발하는 연구는 우리쌀의 국제경쟁력을 제고하기 위하여 필수적이며 매우 시급하다.
- (4) 국내 종자산업은 대부분 전통적인 육종방식에 기반을 두고 있는데, 새로운 형질 도입과 육종효율의 향상을 위해 분자육종의 도입이 절실히 요구된다. 그러나 분자육종을 수행할 수 있는 육종기관은 대형 종묘회사와 농촌진흥청 산하 육종기관에 국한되어 중소형의 민간 육종회사에서는 분자육종을 시도하지 못하고 있다.

나. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발 및 지원 서비스

- (1) 건강한 식습관에 대한 관심이 높아지면서 기능성/생리활성 생화학 성분을 많이 함유하고 있는 작물에 대한 수요가 늘어감에 따라 기능성/생리활성 생화학 성분이 강화된 작물 품종을 육종하기 위한 연구가 활발히 진행 중이다.
- (2) 하지만 국내에서 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 지원 서비스를 전문적으로 수행하는 기관이 없거나 민간육종가나 소규모 종자회사의 경우 고가의 분석 수수료가 부담되어 기능성/생리활성 생화학 성분에 대한 품질 육종 연구가 활성화되지 못하고 있다.
- (3) 기존 품종 중에서도 생리활성을 인정받은 기능성/생리활성 생화학 성분을 정밀하게 분석하기 위한 분석기술이 필요하다.
- (4) 따라서 산·학·관·연·민 등 육종단체의 연구/실용화 비용을 절감, 작물 품질 육종 연구의 활성화를 위해서 작물별 기능성/생리활성 생화학 성분 다성분 동시 분석기술을 확립하고, 저비용·신속·정밀 분석 서비스를 제공할 수 있는 시스템이 필요하다.

다. 고추에서 분자마커 분석 서비스 지원 및 TMV 저항성 L 유전자좌와 매운맛 함량 조절유전자 연관 마커 개발

- (1) 우리나라에서의 고추는 지난 10년간 연간 총생산액 1조 2000천억 - 1조 5천억 원에 달하는, 농가경영에 있어서 가장 중요한 채소작물이며 김치, 고추장 등 관련 산업의 규모 또한 3조원 이상으로 추정되고 있는 중요한 경제작물이다. 그러나 최근 중국으로부터 수입량이 지속적으로 증가함에 따른 재배면적 및 생산액이 매년 감소하고 있는 추세이며 이는 FTA 협상 등을 통하여 가속화 될 것으로 전망되는바 새로운 기술개발 및 신품종 육성을 통한 경쟁력 제고가 필요한 실정이다.
- (2) 몬산토(세미니스) 및 신젠타와 같은 다국적 기업의 경우 거대자본을 투입하여 주요 작물에 대한 분자마커 개발 및 이를 상업육종에 적용하는 대량분석 시스템을 완비하고 있다. 그러나 우리나라는 고추 육종 기술에 있어서는 이미 세계적인 수준을 능가하고 있는 반면 분자마커의 개발 및 육종에의 적용에 있어서는 이제 시작단계에 있어 분자마커 분석 서비스를 지원함으로써 점차 수준을 끌어올려야 할 필요성이 있다.
- (3) 현재 고추 TMV 저항성 육종은 대부분 L^2 , L^3 또는 L^4 를 한 친에 사용하여 F_1 품종을 만들고 있으나, 앞으로는 한 친에는 L^3 를 다른 한 친에는 L^4 를 넣어 L^3 와 L^4 를 동시에 가지는 F_1 품종을 개발하는 방향으로 바뀔 것이다. 이를 위하여 L 유전자좌의 대립유전자좌를 모두 구분할 수 있는 분자마커 개발은 절실히 요구되고 있다.
- (4) 고추 매운맛에 관해서는 고춧가루와 같이 아주 많이 매운맛이 요구되는 경우도 있고 풋고추처럼 적당히 매운맛이 요구되는 경우도 있어 매운맛의 함량이 다양한 고추 품종이 절실히 요구되고 있다. 이를 위해 매운맛 함량을 조절하는 유전인자를 분석함과 동시에 이와 연관된 분자마커의 개발은 앞으로의 매운맛 육종에 있어 아주 중요한 역할을 할 것이다.

라. 약용 및 식량작물의 고품질 육종 분자표지 개발

- (1) 고려인삼은 우리나라 고유의 천연자원으로 수천 년 동안 '영약'으로 국제적으로 널리 인지되었지만, 인삼의 품종 개발과 품종 보호를 위한 분자수준에서의 연구는 극히 미비한 상태이다.
- (2) 식물의 유전체 연구, 생물정보학 및 DNA 마커를 기반으로 한 품종보호, 작물육종 효율 증진은 가장 실용적으로 이용되고 있는 생명공학 기술이다.
- (3) 국제적으로 고려인삼의 경쟁력이 미국산 인삼(*Panax quinquefolium*)에 비해 경쟁력이 약화된 상태이며, 또한 고려인삼이 중국에서 재배되어 역수입되는 등의 문제점을 진단할 수 있는 동정방법 개발이 시급한 상태이다. 최근 분리육종에 의해 고품, 금품, 선품, 연품, 선원, 천품 등과 같은 인삼품종들이 육성되었고 이 품종들의 특성이 우수하여 점차 재배가 확대되었지만 아직까지 90% 이상이 재래종 혼계를 재배하고 있는 실정이며, 종자보급의 불투명성과 품종구분의 불명확성으로 인해 종자분쟁의 가능성을 내재하고 있어 지역 재래종을 포함한 품종 간 동정방법 개발이 시급한 상태이다.
- (4) 인삼의 유전적 다양성에 대해 종합적인 분자유전학적 자료를 제공하여 교잡육종 체계

개선을 도모할 필요가 절실하며 주요 약용성분에 대한 효율적인 분석 지원 체계도 필요한 상황이다.

- (5) 인삼이 포함된 오가과(Araliaceae) 식물에는 가시오가피 등 약용식물이 포함되는데, 이들 약용식물에 대한 기원 판명을 위해 분자 마커의 개발 및 유효 약용성분의 함량 표준화 및 이를 바탕으로 한 육종기술 향상이 필요하다.
- (6) 식미(eating quality of rice seed after cooking)는 단백질, 지방, 탄수화물 그리고 미량 원소에 의해서 결정되는 것으로 보고되어 있으나, 실제로 고식미와 저식미를 분석한 결과, 이들 함량에는 큰 차이가 없는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 고식미와 저식미를 결정하는 중요 요인중의 하나가 단백질, 지방, 탄수화물의 상호 유기적인 변이 즉, 전사후변이(post-translational modification)에 있다고 판단된다. 본 연구에서는 미량으로 벼 종실에 축적(존재)되는 단백질 변이체(post-translatome)를 동정하여 식미 영향 여부를 밝히고, 식미를 판명하는 방법 개발이 필요하다.
- (7) 농산물에 대한 소비자의 선호도는 양보다 질로 옮겨가는 추세이며 이는 기능성 배추가 시장 수요에 필요 및 부합한다고 할 수 있다. 배추 및 양배추 등과 같은 배추 속 작물들의 genome 서열이 완전히 분석되어 공개되었으나, 카로티노이드 생합성 관련 유전자에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 하지만 genome 서열이 완전히 공개되었기 때문에 카로티노이드와 관련한 유전자의 연구를 위한 유전정보 사용 및 유전체학적 접근을 하기 좋은 조건이다.
- (8) 오렌지색 내염을 갖는 배추의 카로티노이드 함량분석, QTL 및 연관 마커에 대한 연구는 일부 보고되었으나, 이 형질의 직접적인 원인 유전자에 대한 연구는 아직 보고되지 않아, 이를 밝혀내고 이와 관련된 분자마커의 개발이 필요하다.
- (9) 피트산(phytate)은 6개의 phosphate기를 함유한 환상화합물(inositol)로서 콩과 대부분의 콩제품에 건조 중량의 약1.0~ 3.0%가 함유되어 있다. 콩에서의 인의 피트산 분자와 결합되어 있으므로 피트산은 Ca, Mg, Zn, Fe과 같은 2, 3가 이온과 chelate를 형성하여 소장에서의 흡수를 어렵게 한다. 또한 피트산은 무기질의 이용을 간섭하여 비영양성분의 역할을 하는 것은 물론, 단백질염기와 강하게 결합하여 pepsin, trypsin, α -amylase 등의 중요한 소화효소의 작용을 방해한다. 이와 같이 비영양적인 성분의 농도를 낮추기 위해 종실 중의 phytate 함량관련 분자마커를 개발하여 육종단계에서 phytate 함량이 낮은 품종을 육성하는 것이 필요하다.

마. omics 기술을 활용한 배추 환경내성 마커 개발 및 유전자 동정

- (1) 전통적인 교배선택 육종기술은 국내 작물 육종체계에서 중요한 핵심 전략이며, 작물 농업형질 개선과 신품종 육성에 지대한 기여를 했다. 지금도 이 육종기술은 농업형질 개선의 핵심 전략으로 자리 잡고 있으나, 점차 그 한계점에 다다른 듯 과거와 같은 획기적인 육종개량 성과를 기대하기 어려워졌다. 농업환경의 변화와 소비자의 새로운 수요에 맞춰 지속적인 농업형질 개량이 요구되고 있는 상황에, 분자생물학기술의 도입은 이런 한계점을 극복할 수 있는 해결책으로 기대를 모으며, 이미 분자유종은 육종기술에서 중요한 부분으로 자리 잡았다.

- (2) 최근 우리나라에서 배추 genome 서열을 분석하여 보고되었고, 이러한 유전체 정보를 기반으로 하는 유용유전자의 탐색이 대규모로 행해지고 있다.
- (3) 단백질체학은 조직 또는 세포에 존재하는 단백질의 발현을 탐색하는 학문이다. 즉 유전체의 기능 연구를 통해서 유용유전자를 탐색하는 학문이다. 단백질은 유전자의 최종 산물이며, 생체 세포에서 직접적인 기능을 하는 물질로, 이들의 발현을 분석하는 단백질체학 연구는 세포 내에서 일어나는 직접적인 상황을 보여주는 장점이 있다. 육종연구와 접목한 단백질체학 연구로 농업형질에 관여하는 유전자들의 유전체상의 분포, 구성, 및 발현이 탐색될 수 있으며, 특정한 환경이나 농업형질에 대하여 특이적으로 발현하는 단백질들이 검출될 경우, 이들은 그 형질의 발현에 관여하는 후보 단백질로 선발되어 후속 연구를 통해 육종프로그램에 제공 될 수 있다.
- (4) 일반 식물의 분자생물학 연구와는 다르게 작물의 농업형질에 관한 연구는 다양한 환경 처리 및 유전형질의 분석이 필요하기 때문에 단백질체 분석연구에 있어서 많은 실험 처리 및 반복이 필요하여 high-throughput 단백질체분석 법을 활용하면 효율적이다.
- (5) 최근 기후변화 및 온난화로 건조, 고온장해 등이 작물재배에 있어서 문제가 되고 있고, 환경 내성을 가진 작물육성이 중요해지고 있다.

바. 수박 고품량 라이코핀 분자마커 개발 및 이를 이용한 수박 품종개발 시스템 구축

- (1) 최근에 건강기능성 관심고조와 소비자가 선호하는 시장으로의 변화 등으로 인해 수박의 라이코핀이 주목을 받기 시작하였지만, 우리나라에서는 그에 대한 유전자원과 육종기술이 확보되지 않고 있다.
- (2) 전 세계적으로 분자유종 기술의 발달로 선발의 효율과 육종 지역의 제한 극복 등에 많은 기여를 하고 있지만, 수박에 있어서 국내에서 개발된 분자마커가 전무한 실정으로 이에 대한 개발, 연구인력 확보가 필요한 실정이다.
- (3) 종자시장의 급격한 변화, 소비자의 빠른 기호도 변화에 선제적으로 대응하기 위해서는 한국에서 작물재배가 되지 않는 계절에 열대지방에서 세대진전 및 선발 등을 통해 육성 연한을 단축하는 것이 시급한 실정이지만, 아직 효율적이고 체계적인 시스템이 구축되지 않았기 때문에 이에 대한 시스템 구축이 필요하다.
- (4) 생명공학적인 기법인 분자마커 선발(MAS : Marker Assisted Selection) 시스템을 전통 육종에 접목함으로써 육종 선발효율성을 증가시켜 경쟁력 있는 육종체계를 구축할 수 있다.
- (5) 아직 국내외적으로 미개발된 라이코핀 함량이 높은 기능성 수박 품종을 개발함으로써 점차 축소되어가는 국내 종자시장의 확대와 수출시장의 개척으로 국제경쟁력을 강화할 수 있다.

2. 연구개발의 최종 목표

- (1) 벼 식미 및 품질 관련 유전자를 발굴하고 분자마커를 개발한다.

- (2) 벼, 고추, 배추, 인삼, 콩 등 다양한 작물의 분자마커 지원서비스를 수행한다.
- (3) 분자마커 활용 워크숍 프로그램을 진행하여 분자유종 저변을 확대한다.
- (4) 각종 작물의 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술(다성분 동시 분석)을 개발한다.
- (5) 민간 육종가와 종자회사의 수요와 요구를 반영하여 생화학 성분 분석 기술을 추가로 확립하고, 확립된 분석 기술을 바탕으로 생화학 성분 분석 서비스를 지원한다.
- (6) 체계화된 지원 서비스를 통해 민간육종가와 종자회사의 기능성 성분 강화 작물 육종의 성공여부를 결정하는데 도움을 주고, 생화학 성분 분석에 대한 연구를 활성화하여 궁극적으로 작물의 부가가치를 증진시키는데 기여한다.
- (7) 고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자(L^1 , L^2 , L^3 , L^4)를 모두 구분할 수 있는 분자마커 세트를 개발하고 실용화 한다.
- (8) 고추 매운맛 함량 조절유전자와 연관된 분자마커를 개발하고 실용화 한다.
- (9) 인삼이 포함된 오가과(Araliaceae) 식물에는 가시오가피 등 약용식물이 포함되는데, 인삼과 더불어 이들 약용식물에 대한 기원 판명을 위해 분자 마커를 개발한다.
- (10) 미량으로 벼 종실에 축적(존재)되는 단백질 변이체(post-translatome)를 동정하여 식미 영향 여부를 밝히고, 식미를 판명하는 방법을 개발한다.
- (11) 배추의 고함량 베타카로틴 생합성 관련 분자마커를 개발한다.
- (12) 콩에서 비영양적인 성분인 phytate의 함량을 낮추기 위한 관련 마커를 개발 하고 적용한다.
- (13) 배추 내건성 및 고온저항성 마커를 개발 하고 유전자를 동정한다.
- (14) 라이코핀 함량이 높은 수박 유전자원을 도입하고, 기존 우수 계통과의 F1 작성 및 분자 마커 개발용 분리세대를 작성한다.
- (15) 수박 고함량 라이코핀 연관 분자마커를 개발한다.
- (16) 수박의 해외 세대 진전 기지 구축을 위한 계통 및 품종 재배시험을 시행한다.
- (17) 해외 세대 진전 시스템과 분자마커를 이용하여 효율적인 수박 품종개발 시스템을 수립한다.
- (18) 고함량 라이코핀 수박 품종을 개발한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내외 관련분야 기술개발 현황

1. 작물 품질육종을 위한 분자마커 개발 검증 및 지원 서비스 분야

가. 벼 품질 관련 분자 마커 연구

- (1) 식량과학원에서는 식미가 우수한 품종을 육성하기 위한 교배 선발육종에 주력하여 삼광벼, 일품벼, 고품벼 등의 품종을 육성하였고, 돌연변이를 이용하여 고섬유질 품종, 고라이신 품종 등을 육성하였다. 그러나 식미 및 기능성 성분들의 유전자 연구는 거의 없으며, 분자 표지도 개발되어 있지 않다. 특히 우리나라 벼 품종에 대한 염기서열 재분석 연구가 없어 우리에게 필요한 유전자정보가 부족하다. 농업생명과학원에서는 주로 비타민A 함유 벼 등 형질전환 벼의 개발에 주력하고 있다. IPET 과제로는 저피틴산 쌀, 거대배아쌀 등이 개발되었고, 바이오그린21 연구에서는 유전자원의 기능성 성분 조사와 형질전환 벼의 개발 연구가 되었다.
- (2) 일본에서는 벼 게놈프로젝트를 주도적으로 완성하면서 벼의 유전자들을 발굴하는 국책 프로젝트를 추진 중이다. 국제적으로 인정된 양식미 품종인 고시히까리 등에 대한 염기서열 재분석을 완료하였고, 이를 토대로 정밀 육종을 계획 추진하고 있어서 향후 연구개발 성과의 파괴력이 예상된다. 중국은 국가 지원하에 인디카 벼 염기서열 분석을 수행하였고, 분자육종이 국책연구로 진행 중이다. 미국에서는 DBRRI연구소와 대학 등지에서 육종기초연구 및 염기서열분석 연구를 수행하고 있으며, 강력한 생물정보학 시스템을 구축하고 있다. 전반적으로 유전체를 기반으로 하는 유전자 분리 연구와 분자마커 개발 및 분자육종 연구에 집중 투자를 하고 있으며, 다른 종의 유용한 유전자를 형질전환하는 연구도 병행되고 있다.

나. 분자마커 지원 서비스

- (1) 국내에서는 국공립, 민간 기관을 통틀어 이에 대한 체계적인 지원체제가 구축되어 있지 않다. 단지 교육과학기술부 과학재단 산하 기초과학지원연구원 7개 센터가 있어, 일반 이화학적 성분 분석업무 등을 지원하고 있다. 한국식품연구원과 농촌진흥청 국립농업과학원 내에 한식세계화연구단 내에 품질 분석 시설이 가동되고 있으나 작물 분자육종을 위한 분석 지원체제는 안되어 있다. 국립농업과학원 농업생명자원부, 국립식량과학원, 국립원예특작과학원에 분자마커개발을 위한 기본 설비가 있으나 자체의 연구지원이나 지원서비스 중계 역할에 주력 중이며, 대외 지원을 위한 체제가 구축되어 있지 않다. 관련 분야 교육 프로그램은 국내에는 전무한 상태이다.
- (2) 농업분야에 특화되어 있는 종합 분석지원체제는 서울대학교 농업생명과학대학의 “농업생명과학공동기기원”이 국내에서 유일하다. 유전체분석, 품질분석, 환경성분 분석 등 종합 분석지원시스템과 장비를 구축하고 있어 분자육종 기반 연구를 위해 이를 활용하면

시너지 효과가 기대된다. 또한 서울대학교 “식물유전체육종연구소”는 작물의 분자유종을 위한 기반 연구에 착수하였으며, 관련 분야 연구와 지원 및 전문가 양성 업무에 핵심역할을 할 것으로 기대된다.

- (3) 국제적으로는 국제기구들 CIMMYT, IRRI, ICRISAT 등에서 특정 작물을 대상으로 분자마커 개발 교육 등을 실시하고 있다. 최근 필리핀 IRRI에서는 GSL(genotyping services laboratory)를 열고 첨단 장비를 통해 분자 마커 분석을 해주 있다. 대학에서는 미국 Cornell대에 Institute of Genomic Diversity, UC Davis의 Seed Biotechnology Center 등에서 식물의 유전체와 육종에 관한 정기적인 training course를 개설하고 있다. 네덜란드의 Wageningen 대학에서는 분야별로 학제간 연구소를 개설하여 직접 연구를 수행하며, 전문가를 대상으로 각종 교육 프로그램도 운용하고 있다.

2. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발 및 지원 서비스 분야

가. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발

- (1) 국내외에서 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 기술은 주로 대학의 연구목적으로 개발되고 있다. 그러나 성분 분석 기술을 개발하기 위해서는 고가의 정밀 분석 장비가 구비되어 있어야 하고 그러한 시스템을 갖춘 연구기관은 많지 않다.
- (2) 쌀에서의 GABA는 OPA, NH 등의 유도체화 과정을 거쳐 LC-UV나 FLD로 많이 분석하고 있다. 의약분야에서는 neurotransmitter인 GABA의 함량을 분석하기 위해 LC-ECD를 사용하고 있다. 그러나 HPLC 방법은 전처리, 유도체 과정이 복잡한 단점이 있다. 최근 EZ:Faast kit(GC-FID)를 이용하여 GABA를 비롯한 다양한 amino acid 분석 연구가 진행되고 있다.
- (3) 콩류에서의 isoflavone 동시 분석에 대한 연구는 많이 진행되어 있다. Isoflavone 배당체와 비배당체 6종을 포함하여 malonyl, acetyl 배당체를 포함한 총 12종 동시 분석기술이 개발되어 있다.
- (4) 검정콩의 anthocyanin 정량분석 연구에서는 delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside만을 동시분석 하였다. 대부분의 연구에서는 anthocyanin 중 함량이 높은 cyanidin-3-glucoside과 비배당체 형태인 cyanidin을 분석하였다. 베리류 연구에서는 glucoside가 아닌 xylose, arabinose 등 다른 종류의 배당체에 대한 동시 분석 기술이 개발되어 있다. LC-MS를 이용한 다성분 동시분석 기술도 많이 진행되고 있다.
- (5) 십자화과에 존재하는 glucosinolates 성분은 주로 LC-MS 분석 기술이 개발되어 있는데 국외에서는 neutral loss 기술을 적용하여 분석하고 있다.
- (6) 과일 등의 당과 유기산 분석 기술은 각각 10여종 이상의 성분들을 동시분석하고 있는데 당은 주로 RID로 분석하고, 유기산은 phosphate buffer를 이용한 분석 기술이 개발되어 있다.
- (7) 인삼의 ginsenosides에 대한 분석 기술은 국내 인삼연구소에서 많이 진행되었는데 LC-MS/MS를 이용하여 30종 이상의 성분 분석기술을 개발하였다.

- (8) 가시오가피의 eleutherosides 연구는 많이 연구되지는 않았지만 eleutheroside B와 E를
 동시 분석하는 기술이 국내외에서 연구되고 있다.

나. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 지원 서비스

- (1) 국내에서 생화학 성분 분석 서비스를 제공하는 기관들은 주로 일반 성분분석, 영양분석, 품질분석, 위생검사 등의 항목을 서비스 한다. 한국식품연구원, 한국기능식품연구원, 한국식품연구소, 농협식품안전연구원, 농업기술실용화재단의 종합분석검정센터 등에서 기능성/생리활성 생화학 성분들을 분석 서비스하고 있다.
- (2) 하지만 대부분의 분석 기관에서 일반적인 식품공전이나 건강기능식품공전의 분석 방법에 의거하여 서비스를 제공하고 있다.
- (3) 식품분석기관에서는 11-18종의 아미노산 성분을 분석하는데 주로 아미노산 분석기를 이용하여 서비스를 제공한다.
- (4) Isoflavone 성분은 주로 genistein과 daidzein만을 분석 서비스 한다. 대두의 이소플라본 분석을 제공하기도 하지만 대부분 비배당체 형태만을 포함하고 있고, malonylgenistin을 포함하여 분석 서비스하는 기관은 없다.
- (5) 한국식품연구원에서는 capsaicin과 dihydrocapsaicin을 동시분석 가능하지만 대부분 capsaicin만 분석 서비스를 제공한다. Capsiate, dihydrocapsiate 성분을 서비스하는 기관은 없다.
- (6) Anthocyanin, apigenin-7-glucoside (apigettrin), quercetin, ginsenosides, eleutherosides 성분을 분석 서비스하는 기관은 없는 실정이다.

3. 고추에서 분자마커 분석 서비스 지원 및 TMV 저항성 L 유전자좌와 매운맛 함량 조절 유전자 연관 마커 개발 분야

가. 고추 분자마커 분석 서비스

- (1) 국내 현황 : 고추와 육종에서는 고추 형질과 연관된 20여 가지 마커를 서비스해 오고 있는데, 국내에서는 채소병리검정지원사업단에서 바이러스 저항성(*pvr1*, *Pvr4*, Tsw, L^3 , L^4 , Cmr1), 세균성 반점병(Bs2), 종자순도 검정 마커를 서비스하고 있음. 현재 서울대 최도일 교수 실험실에서 역병 저항성 고추인 CM334에 대한 전체 염기서열 분석을 완료하였고, 씨더스에서는 유전체 서열 분석과 관련된 일련의 서비스를 제공하고 있음.
- (2) 해외 현황: 2002년 이스라엘에서 설립된 Genotype DNA markers (<http://www.dyn-rnd.com/our-mission-dyn-rnd>)에서는 Tsw과 L^4 에 대한 마커분석서비스를 수행하고 있음. DNA LandMarkers는 1995년에 BASF 자회사로 출발, 현재는 주로 옥수수, 토마토, 동물의 주요 형질관련 마커서비스만 수행함.

나. 고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자(L^1 , L^2 , L^3 , L^4)를 모두 구분할 수 있는 분자 마커 세트 개발 및 실용화

- (1) 국내 현황: 2008년 국내에서는 최초로 L^4 에서 0.9~1.8 cM 떨어진 L^1 과 L^4 를 구별할 수

있는 마커 개발됨 (Kim, et al., 2008), 2012년에는 서울대 연구진이 L^4 와 0.3cM 떨어진 마커 보고(Yang, et al., 2012).

- (2) 해외 현황: L관련 연구는 주로 일본에서 수행됨. 2003년 RAPD를 이용해 L^4 와 1.5 cM 연관된 WA31-1500S 마커가 개발되었고(Matsunaga. et al., 2003), 2004년에는 DH 집단 이용 L^3 와 3cM 떨어진 SCAR marker 2개 개발(Sugita et al., 2004)됨. 이후 2008년에는 L^3 fine mapping을 통해 400kb 정도의 R-like genes cluster 서열이 분석되었고 이를 통해 L^3 서열 부분을 최초로 동정함(Tomita et al., 2008).

다. 고추 매운맛 함량 조절유전자와 연관된 분자마커 개발 및 실용화

- (1) 국내 현황: 매운맛 함량 조절관련 유전자는 이전의 국내 연구자에 의해 많이 연구되었으나 본 과제에서 사용한 집단에서 나타나는 매운맛을 낮추거나 높이는 주동 유전자에 대한 연구는 이제껏 조사된 적이 없음.
- (2) 해외 현황: 매운맛 함량 조절관련 유전자에 대한 분자마커 개발과 관련된 연구는 많이 되어 있지만 직접적으로 실제 함량과 연관된 분자마커 개발에 관한 연구는 보고된 예가 없음. 2010년 Pun1 유전자도 돌연변이가 발생한 부위에 따라 3가지 유형으로 나눌 수 있고, *C. chacoense* PI260433-np에서 발견한 pun2의 경우 pun1과 대립 유전자가 아님이 보고됨(Stellari, et. al., 2010).

4. 약용 및 식량작물의 고품질 육종 분자표지 개발 분야

가. 인삼과 근연속 약용식물의 품종 및 기원 판별용 DNA 마커 개발 및 지원

- (1) 고려인삼은 우리나라 고유의 천연자원으로 수천 년 동안 ‘영약’으로 국제적으로 널리 인지되었지만, 인삼의 품종 개발과 품종 보호를 위한 분자수준에서의 연구는 극히 미비한 상태이다. 최근 분리육종을 통해 9품종으로 육성이 되었으나, 여전히 재배지역내에 재래종과 혼계되어 재배되고 있다.
- (2) 차세대 염기서열 분석기술의 발전으로 현재 Illumina사의 Hiseq2000 기계는 한 번의 run에 200Gb이상의 서열을 생산해냄. 또한 1 MID(Multiplex identifier)를 붙여 1 lane에 여러개의 샘플을 한꺼번에 분석 가능함. 따라서 한번에 100여개의 샘플 분석이 가능하다.
- (2) 건강이 점점 중요해짐에 따라 약용식물로 주로 사용되는 산형과 및 오가과 식물들에 대한 관심도 높아지고 있으나 산형과 및 오가과 식물들에 대한 유전체 연구는 미미한 상황이다.
- (3) 식물의 엽록체 서열은 150kbp 정도로, 산형과 및 오가과 중에서는 고려인삼만이 엽록체 서열이 밝혀져 있다.

나. 고품질 벼육종을 위한 미량단백질 분석기술 개발

- (1) 식미(eating quality of rice seed after cooking)는 단백질, 지방, 탄수화물 그리고 미량 원소에 의해서 결정되는 것으로 보고되어 있으나, 실제로 고식미와 저식미를 분석한 결

과, 이들 함량에는 큰 차이가 없는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 고식미와 저식미를 결정하는 주요 요인중의 하나가 단백질, 지방, 탄수화물의 상호 유기적인 변이에 의한 미량 단백질과 관련 있을 것으로 예상되고 있다.

다. 카로티노이드 고함량 배추 연구

- (1) 총 카로티노이드 및 특정 카로티노이드 성분의 함량 증가가 보고(Watanabe et al., 2011)된 오렌지 배추는 일반 배추와 turnip간의 교배를 통해서 “오렌지퀸(Orange queen)”이라는 품종으로 일본에서 최초로 개발되었으며, 이후 오렌지퀸의 오렌지 내염색이 열성 단일 유전자에 의해 조절 받을 수 있음이 알려져 왔다 (Matsumoto et al. 1998; Zhang et al. 2008; Feng et al. 2012).
- (2) 몇몇 연구에 의해서 오렌지 내염을 가지게 하는 원인 유전자를 찾으려는 시도가 있었으나 연관된 분자 마커만이 보고되었다 (Zhang et al. 2008; Feng et al. 2012).

라. 콩 종실 phytate 함량 관련 마커 개발 및 적용

- (1) 저피틴산 대두 돌연변이인 *Gm-lpa-ZC-2*와 관련하여 돌연변이를 분양한 중국 Qingyao Shu 그룹에서 2011년도엔 Fine mapping 논문을, 2012년도에 관련 유전자인 IPK와 CAPS 마커논문이 발표된 바 있다.

5. omics 기술을 활용한 배추 환경내성 마커 개발 및 유전자 동정 분야

- 가. 기존 논문은 배추 병저항성 마커분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 기능성 불량환경 극복 관련 유전자 탐구 방향으로 연구를 추진하여 SCI 논문을 게재할 계획임.
- 나. 배추 국내 재배면적은 37,285ha로 생산량은 2,584,908톤이다. 재배면적은 2001년 이후 연평균 4%씩 감소하는 추세이고 생산량 또한 연평균 4%씩 감소하는 추세에 있다. 이는 배추 1인당 소비량이 생활 패턴의 변화로 인한 김치 수요의 감소와 김치냉장고 보급으로 인한 김치 공급의 연중 안정화 그리고 중국 김치 수입의 증가로 인한 것으로 보고 있다. 최근 기후변화로 인한 생리장해 등이 문제되고 있고 이를 극복할 수 있는 안전정적으로 수량을 생산하는 품종들이 육성되어야 한다. 본 연구에서는 불량환경 대응 유전자를 탐색하고 이를 마커화하여 육종 프로그램에 제공하고자 한다.

6. 수박 고함량 라이코펜 분자마커 개발 및 이를 이용한 수박 품종개발 시스템 구축 분야

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

- (1) 국내에서는 기존의 품종들이 도홍색에서 선홍색 계열로 라이코펜 함량이 대부분 40mg/kg으로 낮은 상태이고, 아직까지 수박의 라이코펜이 소비자의 인식을 받지 못하여 품종 개발 노력이 많지 않음.
- (2) 국내 고함량 라이코펜 등 기능성 성분이 강화된 품종이 개발되어있지 않음.

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- (1) 현재까지 상업화된 품종에서 라이코핀 함량은 2배체에서는 Hazera seed company에서 발표한 Summer Flavored 810, 710이 각각 75.4mg/kg, 82.3mg/kg으로 가장 높은 그룹에 속해있고, 3배체에서는 Hazera에서 발표한 Xite가 99.8mg/kg으로 가장 높다고 알려져 있으며 최근에 중요성이 부각되면서 각 종자회사에서 라이코핀 함량이 높은 수박 품종을 개발해가고 있음.

2절. 연구 결과가 국내외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치

1. 작물 품질육종을 위한 분자마커 개발 검증 및 지원 서비스 분야

가. 벼 식미 및 품질 관련 유전자 발굴 및 분자마커 개발

벼의 당질배유 돌연변이체의 연구 분야에서는, 벼의 식미에 주된 영향을 주는 배유 전분 생합성 경로에 집중하여 그와 관련한 유전자의 기능을 밝히는데 주력했다. 그 결과 기존에 연구된 전분 생합성 관련 유전자의 또 다른 새로운 기능을 확인하였고, 이는 기존의 전분 생합성 경로 모델을 더욱 정확하게 구현하는데 큰 도움을 줄 결과라고 본다. 이 연구분야는 세계 선도적 위치에 있으며 곧 논문으로 발표될 예정이다.

우리나라를 포함해 국제적으로 다양한 품종의 염기서열 재분석이 활발히 진행되고 있는 현 시점에서, 각 품종들이 특이적으로 가지고 있는 일부 염기서열의 기능에 집중한 연구 결과가 미비한 상태이다. 식미 관련 분자표지 'P5' 연관 유전자 발굴 연구는, 다양한 실험 기술과 최신 염기서열 분석기술을 이용하여 품종 특이적 서열의 새로운 기능을 밝히고, 더 나아가 염기서열의 구조 변화를 통해 벼 품종의 기원을 추적할 수 있다는 점에서 의미가 있다. 특히 품종 특이적 서열이 벼 식미에 영향을 미치는 중요한 부분일 것이라 예상되어, 이 연구의 결과가 추후 고식미 벼 육종에 일조할 것으로 기대된다.

식미 마커 세트의 개발 및 개량 연구는, 수치화하기 힘든 식미치를 분자 마커를 이용해 높은 정확도로 수치화 한 세계 최초의 시도라는 점에서 의미가 크다. 자포니카 벼의 식미 마커 세트의 개발을 시작으로, 그 일부의 식미 마커를 더욱 이용하기 편리하도록 개량하였고, 식미를 측정하기 어려운 인디카 식미 마커 세트도 추가로 개발하였다. 이로써 분자 마커를 통해 우리나라뿐만 아니라 전 세계 재배벼의 식미를 예측할 수 있게 되었으며, 나아가 식미의 수치화를 통해 보다 빠르고 정확한 고식미 품종 육종 전략을 구현할 수 있을 것이라 전망한다.

나. 분자마커 지원 서비스

국내외에서 개발된 분자 마커들이 실제 육종현장에서 사용될 수 있다면 작물의 경쟁력을 한단계 끌어올리고 우리나라 육종 현장을 훨씬 더 효율적인 시스템으로 변화 시킬 수 있을 것이다. 그러나 특별히 영세하고 전통육종을 지속해온 민간육종가가 분자 육종 기술의 혜

택을 보고 육종 현장에서 실제적인 도움을 받기에는 비용적인 부분 뿐 만 아니라 현장과의 소통 면에서도 어려움이 많다.

이런 측면에서 볼 때 민간과 분자 육종 기술 및 지식이 집적되어 있는 연구 기관과의 접촉점을 마련하고 수요에 맞춘 분자 마커 지원 서비스를 제공 할 수 있는 기관으로서 본 사업단은 큰 의미가 있다고 할 수 있다. 또한 다양한 작물과 다양한 마커를 대상으로(특정 작물 및 마커에 한정 하지 않음) 분자 마커를 지원하는 기관이 전무한 국내 상황에서 본 사업단이 지원 시스템을 마련하고 국내에 실제 적용하였다는 의미가 있다. 고가의 비용으로 한정된 작물과 마커를 서비스 하는 회사가 있기는 하지만 이는 “지원”의 개념으로 볼 수는 없으며, 순수 정부 연구개발 사업으로써 이러한 지원사업을 시행함으로써 인해 민간은 비용 및 정보 누출, co-work의 부담감 및 지적권 분쟁의 우려 등의 어려움 없이 분자마커 서비스를 받아 볼 수 있게 되었다.

그러나 이 역시 개발된 마커에 대한 민간 육종가의 이해가 동반 되어야 하므로, 사업단에서는 5년동안 분자 마커 활용에 대한 민간 교육을 5차례에 걸쳐 실시하고, 각 교육마다 1주일 동안 이론과 실습을 모두 병행 교육 하여 민간육종가의 분자 육종에 대한 이해도를 높여 주고 분자 마커 서비스를 더 효율적으로 이용하는데 도움을 주려고 하였다.

향후에도 국내 분자마커 지원서비스에 대한 수요는 계속적으로 증가할 것이며, 정부의 민간육종 연구단지 조성 후 실행 하게 될 육종지원 사업은 본 사업단 보다 훨씬 더 큰 규모로 지원사업을 진행하게 될 것이다. 민간 육종 연구단지의 본격 가동을 위하여 본 사업단은 모델 시스템으로 의미가 있으며 많은 정보와 기술력 노하우가 전수되어 향후 지원사업 발전에 큰 밑받침이 될 시초 사업단이다.

2. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발 및 지원 서비스 분야

가. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발

- (1) Capsiate, dihydrocapsiate, anthocyanin, apigenin-7-glucoside(apigetrin), quercetin, ginsenosides, eleutherosides 등 타 기관에서 제공하지 않는 중요 기능성/생리활성 생화학 성분 분석기술을 확립하여 국내 독보적 위치를 확보하였다.
- (2) 일반적인 단일 성분 분석법에서 다성분 동시 분석 기술을 확립하였다.
- (3) HPLC, GC 뿐만 아니라 GC-MS, HPLC-MS/MS등 고가 첨단 분석장비를 활용하여 결과의 신속성, 신뢰성, 정밀성 제고하였다

나. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 지원 서비스

- (1) Capsaicinoid의 capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate 성분, 포도 및 땅콩나물의 resveratrol, 베리류와 복숭아의 anthocyanin(7종), 콩에서의 isoflavone (genistein과 daidzein을 포함한 7종), 파프리카의 apigenin-7-glucoside 성분, 양파의 quercetin 성분, 인삼의 ginsenosides, 가시오가피의 eleutherosides 등 산·학·관·연·민 등 육종단체의 요구를 적극 반영하여 타 기관에서 제공하지 않는 중요 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 서비스를 제공하였다.

(2) 다양한 작물별 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 서비스를 통해 품질 육종 연구를 위한 지원 서비스 시스템을 구축하였다.

3. 고추에서 분자마커 분석 서비스 지원 및 TMV 저항성 L 유전자좌와 매운맛 함량 조절 유전자 연관 마커 개발 분야

가. 고추 분자마커 분석 서비스:

국내외 고추 분자마커 서비스관련 학교나 업체는 형질과 연관된 분자 마커의 종류가 적은 편임. 이에 반해 (주)고추와 육종에서는 20여종 이상의 다양한 분자마커를 확보하고 있을 뿐만 아니라 지속적인 연구개발로 고추용 분자마커 서비스업체로서의 위치를 공고히 함과 동시에 양질의 분자마커서비스를 지속적으로 제공하고 있음.

나. 고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자(L^1 , L^2 , L^3 , L^4)를 모두 구분할 수 있는 분자 마커 세트 개발 및 실용화:

고추의 L 저항성은 고추품종을 구성하는 기본형질로 그 중요성에 힘입어 지난 20년간 유전분석 및 마커개발, 유전자 클로닝 등에 다양한 연구 성과가 이루어짐. 타 연구자의 결과는 다소 학문적인 측면이 강한데 반해 (주)고추와 육종에서 실제 고추육성현장에 적합하도록 L allele의 유형을 간단히 구별할 수 있는 마커 셀을 이번 과제를 통해 개발함. 또한 개발한 마커를 실제 유성재료로 사용되는 다양한 재료에 적용해 봄으로써 L 유전형 판독에 관한 많은 노하우를 획득하여 대외 경쟁력을 갖게 되었음.

다. 고추 매운맛 함량 조절유전자와 연관된 분자마커 개발 및 실용화:

매운맛 함량 조절관련 유전자에 관한 연구는 오랫동안 국내외에서 진행되어 왔음. 본 과제에서 사용한 매운맛 함량을 낮추거나 높이는 유전자는 지금까지의 연구와는 다르게 매운맛 함량에 작용값이 매우 높은 유전자임. 특히 LP 유전자는 매운맛 품종을 개발하려는 국내 육종가를 지속적으로 힘들하고 있는 유전자로 본 연구를 통해 minor QTL과 함께 매운맛 낮추는데 관여한다는 사실이 처음으로 밝혀짐. 이를 토대로 LP 유전자 연관 마커를 개발하였으나, 30cM 정도 떨어져 있어 다소 아쉬움이 남지만, 조속한 시일 내에 연관 마커를 개발하여 국내 육종가의 어려움을 해결해 줌과 동시에 LP마커 서비스에 대한 대외 경쟁력을 갖출 수 있을 것으로 기대함.

4. 약용 및 식량작물의 고품질 육종 분자표지 개발 분야

가. 인삼과 근연속 약용식물의 품종 및 기원 판별용 DNA 마커 개발 및 지원

- (1) 본 연구를 통해 개발된 마커들을 이용하여 국내 품종들간의 품종구별이 가능하게 되었으며, 이를 이용하여 국내 재배되는 인삼 뿐만 아니라, 중국, 미국 인삼들과의 구별도 가능케 되어, 품종 보호를 위해 유용하게 쓰일 수 있다.
- (2) 인삼 근연종들의 염색체 분석 및 이를 이용한 마커 개발로 이들의 기원을 판명하고 품종 특이적 마커로 유용하게 사용 될 수 있다.

나. 고품질 벼 육종을 위한 미량단백질 분석기술 개발:

본 연구에서 벼 종자내의 미량 단백질의 프로파일링을 실시하였고, 식미 관련 특이적인 단백질을 동정하여, 고품질 벼 육종을 위한 기반을 마련하였다.

다. 배추의 고함량 베타카로틴 생합성 관련 분자마커:

본 연구에서 찾은 오렌지 내엽색 및 카로티노이드 조성/함량 변화를 일으키는 원인 유전자인 *BrCRTISO1*은 지금까지 국내외적으로 전혀 보고된 적이 없는 신규 유전자이다. 또한 본 유전자 기반 분자마커 역시 세계최초로 개발되었으며 우리나라 배추 육종에 적용되었다.

라. 콩 종실 phytate 함량 관련 마커 개발 및 적용:

저 phytate 함량 콩 육종 소재를 이용하여 국내 품종과의 지속적인 교배를 통해 다양한 육종소재를 마련하였다.

5. omics 기술을 활용한 배추 환경내성 마커 개발 및 유전자 동정 분야

가. 배추 3,009개의 유묘기 배추에서 발현하는 단백질을 동정하였고 이는 국내 배추 단백질체 연구에서 있어서 가장 심도 깊은 단백질 동정으로 동정된 단백질체는 차후 배추 단백질체 연구의 reference로 활용 될 수 있다.

나. 동정된 단백질체의 발현양 변동 추이를 조사하여 내건성 관련 후보 유전자를 제시하였는데, 이 유전자에 대한 다양한 배추유전자원에서의 염기서열 분석으로, 내건성 대립유전자를 동정할 수 있는 연구의 기초 자료로 활용될 수 있다.

다. 선발된 후보 유전자 중 annexin 단백질에 대하여, 벼에서 과발현 형질전환체를 육성하고 있는데 이 과발현 형질전환체의 내건성이 검증 된다면, 다양한 작물에 이 유전자가 활용 될 수 있을 것이다.

6. 수박 고함량 라이코핀 분자마커 개발 및 이를 이용한 수박 품종개발 시스템 구축 분야

가. 고함량 라이코핀 관련 계통 및 품종개발

(1) 고함량 라이코핀 계통 및 품종

(가) 라이코핀 함량이 높고, 원예적 형질이 우수한 계통이 개발되었고 앞으로 품종개발, 유전자탐색 및 개발, 관련 산업에의 활용가능성이 매우 높고 이는 국내외에서 매우 높은 수준의 계통 및 기술을 확보한 것으로 판단됨.

(나) 라이코핀 함량이 기존 품종대비 1.5 ~ 3배 높고, 품질이 우수한 품종들이 다수 개발되어 현재 국내 매출 및 수출에 활용되고 있고, 조만간 선진국시장에 수출 가능한 정도의 높은 품종 수준을 확보하고 있어서 수박에 있어 고기능성 품종개발의 수준을 매우 높였음.

(2) 안정적인 해외 세대진전 시험 체계수립:

다국적기업에서 활발히 진행하는 열대지역에서의 shuttle breeding체계와 다른없는 태국에서의 안정적인 연 3회 시험지 및 시스템을 확립함으로써 보다 효율적이고 신속한 고품질 수박품종 육종체계를 수립함.

나. 고품량 라이코핀 분자마커개발

(1) 연관마커를 개발하기 위한 다양한 분리집단 및 4세트의 Near Isogenic Line집단이 확보되어 분자마커개발, 관련 유전자원 규명 등에 활용되어질 수 있는 기반을 확립함.

(2) RAPD, AFLP, SRAP 분석을 통하여 총 32개의 예비 마커 중에서 11개의 마커가 2개의 계통에서 polymorphim을 보이는 것을 확인함으로써 향후 보다 근접하고 유용성이 높은 분자마커를 개발할 수 있는 기반을 확보함.

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 작물 품질육종을 위한 분자마커 개발 검증 및 지원 서비스 (제1-1 세부과제)

1. 벼 식미 및 품질 유전자의 발굴 및 분자마커 개발

가. 벼 당질배유 전분합성 유전자 발굴 및 분자마커 개발

(1) 돌연변이체 sugary-2의 당질배유 특성

벼 자포니카 품종인 화청에서 유래한 당질배유 돌연변이체는 주름지고 반투명하며 유리당 함량이 높은 종자 특징을 가진다. 특히 sugary-2 (su2)는 당질배유의 특징을 보이면서도 sugary-1 (su1)보다 덜 주름지며 종자의 두께가 좀 더 두꺼워 도정이 가능하기 때문에 su1에 비해 실용성이 우수하다 (그림 1, 표 1). 요오드-요오드화 칼륨 용액으로 각 종자를 염색해 관찰한 결과, 화청 종자는 종자 단면의 전 영역이 염색된 반면 su1은 전혀 염색이 되지 않은 것을 볼 수 있었고, su2는 종자 바깥층에만 한정적으로 염색이 된 것을 확인했다. 따라서 전분 합성 정도에 있어도 su2는 화청과 su1의 중간 형태임을 알 수 있다 (그림 1A).



그림 1. 화청과 당질배유 돌연변이체의 종자 모양 비교. 화청 종자와 비교했을 때 두 당질배유 돌연변이체 모두 주름지고 납작한 표현형을 보이지만, su2의 표현형은 화청과 su1의 중간 형태를 보임. 요오드-요오드화 칼륨 염색 결과도 같은 양상을 나타냄.

표 1. 화청과 당질배유 돌연변이체의 길이, 너비, 두께 비교

재료	길이	너비	두께	길이/너비 비율
화청	4.82b*	2.75a	1.98a	1.75c
su1	4.91ab	2.29c	1.42c	2.15a
su2	4.99a	2.52b	1.51b	1.98b

*다른 알파벳은 유의한 차이가 있음을 의미. 각 시료는 10번씩 측정되었음.

(2) sugary-2 형질을 결정하는 유전자 탐색

su2의 유전분석을 위해 su2와 화청을 정역으로 교배하여 집단을 전개하였다. F₁ 종자 형태는 정상으로, su2의 표현형이 열성 형질임을 확인할 수 있었다. F₁ 식물체의 종자를 전량 수확해 F₂ 종자 표현형 분리비를 확인한 결과, F₂ 종자의 ‘정상:su1:su2’의 표현형 비율이 12:3:1을 따르는 것을 볼 수 있었다(표 2). 이를 통해 su2의 당질배유 형질은 두 개의 열성 유전자가 관여하는 상위효과에 의해 조절된다고 결론지을 수 있다.

표 2. su2와 화청 교배집단에서 F₂ 종자의 표현형 분리

교배 집단	종자 수			Total	$\chi^2_{0.05}$ (12:3:1)	P value
	Normal type	su1 type	su2 type			
화청/47688(su2)	271	57	24	352	1.595	0.451
47688(su2)/화청	152	28	11	191	2.312	0.315

당질배유 형질에 관여하는 상위 유전자를 탐색하기 위해 su2/밀양23의 F₂ 집단으로 유전분석을 수행한 결과, su2의 당질배유 형질을 결정하는 상위 유전자는 8번 염색체에 존재하는 starch debranching enzyme의 일종인 *isoamylase* (LOC_Os08g40930)임을 확인하였다. 즉, su1과 su2의 공통적인 당질배유 형질은 *isoamylase*의 15번째 엑손에서 점 돌연변이가 일어난 결과라 결론지을 수 있다 (그림 2). 그러나 su2는 su1과 비교했을 때 표현형의 차이가 존재하기 때문에, 기본적으로 당질배유 형질을 결정하는 이 유전자 이외에 두께 차이에 영향을 주는 하위 유전자를 탐색했다. 같은 집단을 이용해 유전분석을 수행한 결과 su2의 두께를 결정하는 유전자는 4번 염색체에 존재하는 starch branching enzyme의 일종인 *1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2* (LOC_Os04g33460)임을 확인했다. 두 번째 유전자도 역시 점 돌연변이로 인한 아미노산 치환이 원인이 되어 돌연변이 표현형이 나타난 것이라 할 수 있다 (그림 3).

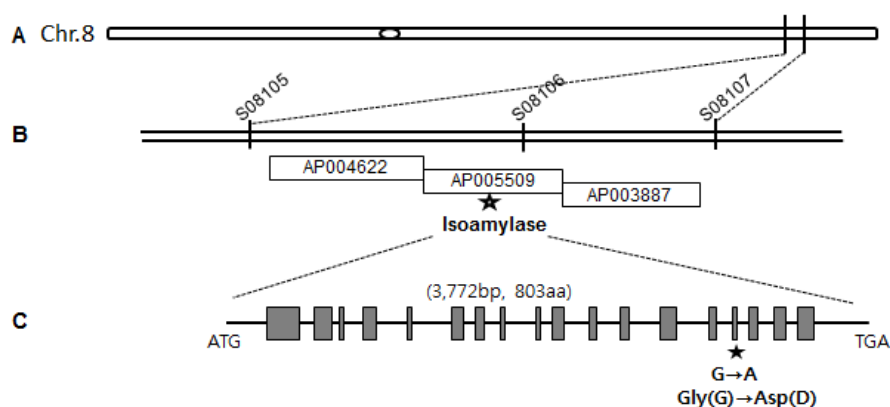


그림 2. 상위 유전자인 *isoamylase*의 유전자 위치 및 유전자 구조. (A,B)*isoamylase* 유전자는 8번 염색체의 긴 팔 위에 존재함. (C)15번째 엑손의 23번째 염기가 G에서 A로 치환되어 아미노산이 글리신에서 아스파라긴으로 변해 돌연변이가 유발되었음.

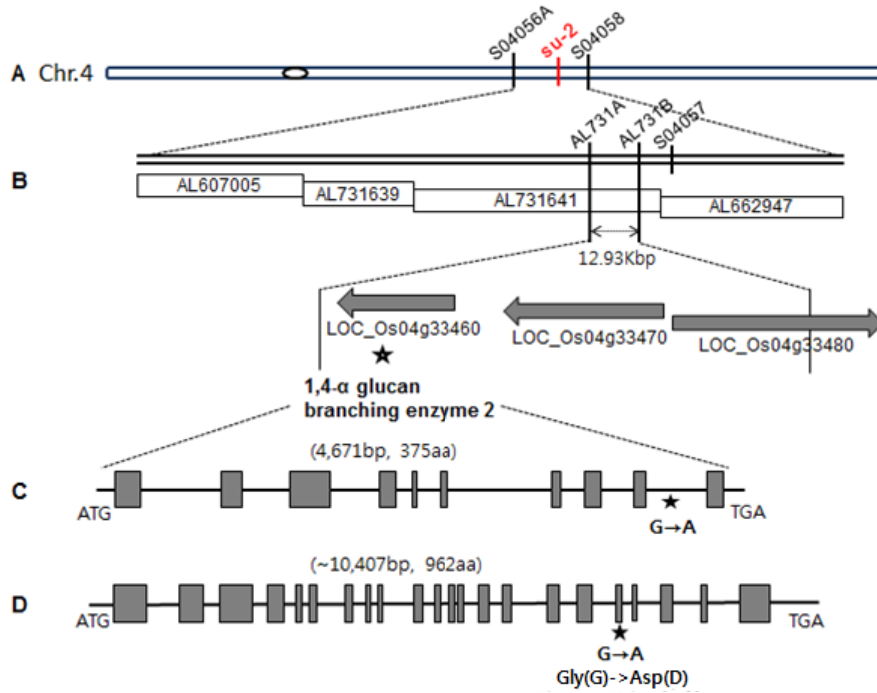


그림 3. 하위 유전자의 역할을 하는 후보 유전자 위치 및 유전자 구조. (A,B)후보 유전자는 4번 염색체의 긴 팔 위에 존재함. (C,D)기존의 자포니카 database에 근거하였을 때, 발견한 점 돌연변이는 마지막 인트론에서 발생한 것으로 여겨졌으나, 이 연구에서 새롭게 분석한 결과 18번째 엑손의 102번째 염기가 G에서 A로 치환되어 아미노산이 글리신에서 아스파라긴으로 변해 돌연변이가 유발된 것을 확인하였음.

8번 염색체의 *isoamylase* 유전자와 4번 염색체의 *1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2* 유전자에 해당하는 dCAPS 마커를 개발하여 공분리 분석을 한 결과, 각 유전자의 점 돌연변이 부분이 표현형과 공분리 하는 것을 확인하였다 (그림 4). 이 때 *1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2* 유전자는 su2에서만 기능을 하기 때문에, su2의 표현형 이외의 형태를 갖는 개체들에서는 dCAPS 마커와 공분리하지 않는다 (그림 4B). 따라서 두 후보 유전자가 su1과 su2의 표현형과 같은 분리양상을 보인다고 말할 수 있다.



그림 4. 두 후보 유전자의 공분리 분석. (A)*isoamylase* 유전자와 당질배유 표현형의 공분리 양상. (B)*1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2* 유전자와 당질배유 표현형의 공분리 양상.

(다) 당질배유 전분합성에 관여하는 후보 유전자의 발현정도 확인

돌연변이체 *su2*의 약한 당질배유 표현형을 결정하는 두 후보 유전자의 기관별 RNA 발현을 조사하였다. 8번 염색체의 *SU1* 유전자의 경우 화청과 서농10호(*su2*) 모두에서 비슷한 양상을 보였다 (그림 5). 잎과 줄기, 뿌리에서는 크게 발현하지 않지만, 종자에서는 그 발현량이 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히 종자 등숙이 가장 활발히 이루어지는 출수 후 20일 정도에 이 유전자의 RNA 발현 정도가 가장 높음을 확인하였다. 4번 염색체의 *SU2* 유전자는 잎에서도 다소 발현되는 것을 볼 수 있다. 그러나 역시 *SU1*과 마찬가지로 줄기와 뿌리에서는 발현량이 현저히 낮은 반면, 종자에서는 발현량이 높다. 두 유전자가 종자에서 모두 발현 정도가 크게 증가하는 것을 보았을 때, 두 유전자는 종자 등숙에 중요하게 관여한다고 예측할 수 있다. 다만 후보 유전자의 돌연변이로 인한 RNA 발현에는 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었다.

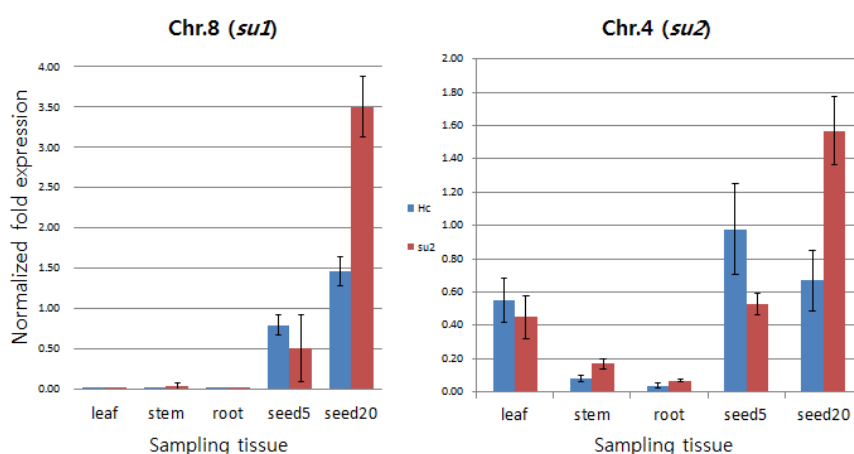


그림 5. 두 후보 유전자의 RNA 발현 정도 측정 결과. 두 유전자간 주요한 차이점은 잎에서의 RNA 발현 여부이고, 공통점은 종자에서 발현량이 크게 증가한다는 것임. Hc: 화청, *su2*: 서농10호, leaf: 3엽기 잎, stem: 파종 후 90일 줄기, root: 파종 후 90일 뿌리, seed5: 출수 후 5일 종자, seed20: 출수 후 20일 종자.

(라) 형질전환 기법을 통한 후보 유전자의 기능 확인

su2 표현형은 두 개의 유전자에 의해 결정이 되므로, 후보 유전자의 기능을 확인하기 위하여 두 개의 유전자 모두에 형질전환을 시도하였다. 동진 종자에서 캘러스를 유도하여 RNA interference(RNAi) 기법을 이용해 두 유전자를 각각 불활성화하였고, *SU1*과 *SU2*가 독립적으로 불활성화된 RNAi 개체를 얻을 수 있었다. *SU1*-RNAi와 *SU2*-RNAi 개체의 유전자 RNA발현을 확인한 결과, *SU1*-RNAi 개체와 *SU2*-RNAi 개체의 경우 모두 아홉 개의 T₀ 개체 중 일곱 개에서 RNAi가 제대로 적용되었음을 확인하였다 (그림 6). *SU1*-RNAi 개체의 T₁ 종자 표현형을 확인한 결과 *su1*과 같은 납작한 당질배유 형태를 보였고, 첫 번째 후보 유전자인 *isoamylase*의 효과를 입증할 수 있었다 (그림 7). 그러나 *su2* 유전자는 독립적으로 기능하지 않기 때문에 표현형에서는 별다른 차이를 보이지 않았다.

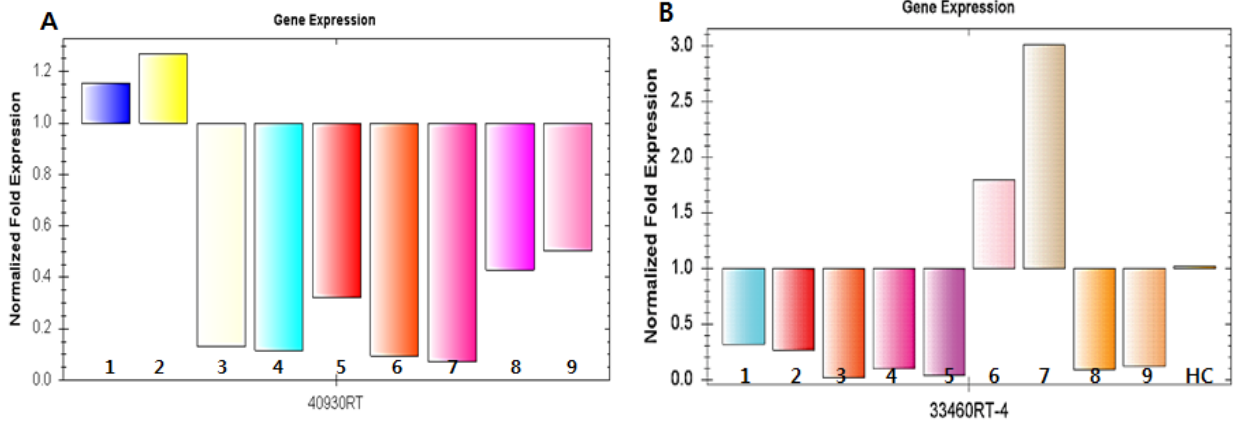


그림 6. Real-time PCR을 이용한, *SU1*-RNAi, *SU2*-RNAi 형질전환체의 각 유전자 RNA 발현 결과. (A)*SU1*-RNAi-3,4,5,6,7,8,9 개체에서 *SU1* 유전자의 RNA 발현이 control(actin) 대비 감소함을 확인함. (B)*SU2*-RNAi-1,2,3,4,5,8,9 개체에서 *SU2*의 RNA 발현이 control(actin) 대비 감소함.



그림 7. *SU1*-RNAi 8번 개체의 T₁ 종자 표현형. RNAi 개체가 Heterozygote 상태임을 고려했을 때, 정상 종자 형태와 더불어 당질배유 종자가 관찰되는 것으로 보아 유전자의 기능이 가설과 일치함을 확인함.

su2 유전자의 기능을 간접적으로 확인하기 위해 형질전환체 및 T-DNA를 인공교배의 재료로 사용해서 교배 종자의 분리 양상을 관찰하였다. *SU2*-RNAi 선발 개체와 *su1*, *su2*를 각각 교배했고, *SU2*의 프로모터 부분에 T-DNA가 삽입된 개체와 *su1*을 인공교배하여 교배 종자를 얻었다. 각 교배의 F₁ 종자는 모두 정상의 표현형을 보였고, F₂ 분리 양상을 통해 최종적으로 *su2*의 기능을 확인할 예정이다. 현재 *su2*에 대한 GUS expression이나 GFP 같은 유전자 기능 확인에 집중하여 추가적인 실험을 진행하고 있다.

나. 식미 관련 분자표지 'P5' 연관 유전자 발굴

(1) 고식미 특이적 분자표지 'P5' 연관 염기서열 확인

(가) 분자표지 'P5'의 특성

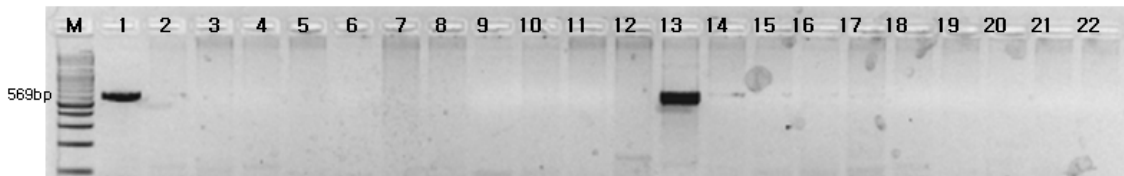
기준에 발표된 연구에 의하면, 식미를 간접적으로 측정할 수 있는 다양한 분자표지가 존재하고 그 각각이 식미에 연관되어 있는 정도가 다르다(Lestari, P. et al., *Food*

chemistry, 2009.) 그 중에서 식미에 가장 많은 영향을 미치는 것으로 측정된 분자표지인 P5는 다른 분자표지들과는 확연히 구별되는 높은 R² 값을 가진다 (표 3). 또한 이 P5는 식미가 좋기로 유명한 고시히카리 유래 품종에서만 확인할 수 있다 (그림 8).

표 3. 기존의 논문에서 분석한 다양한 분자표지들의 식미 측정치. Toyo meter 측정치와 sensory test 값 모두에서 P5의 R² 값이 가장 높게 나타남을 알 수 있음.

PCR primer	palatability by Toyo taste meter (P)			palatability by sensory test (ST)		
	parameter estimate	t value	R ²	parameter estimate	t value	R ²
G4	-16.97 ± 1.19	-14.22 **	0.087	-1.20 ± 0.06	-21.77 **	0.212
M11	-1.94 ± 0.60	-3.25 **	0.096	-0.14 ± 0.03	-5.03 **	0.010
E30	26.55 ± 0.83	32.12 **	0.104	0.86 ± 0.04	19.62 **	0.059
M2CG	-2.40 ± 0.56	-4.33 **	0.060	-0.38 ± 0.03	-15.21 **	0.041
GPA	-21.14 ± 1.11	-19.12 **	0.129	-0.82 ± 0.05	-17.28 **	0.021
S3cl	-1.62 ± 0.62	-2.60 *	0.017	-0.38 ± 0.03	-13.41 **	0.005
P5	19.01 ± 1.32	14.44 **	0.307	1.09 ± 0.04	26.81 **	0.288
B1	6.42 ± 0.77	8.30 **	0.047	0.41 ± 0.03	12.90 **	0.015
CBG	13.45 ± 1.11	12.12 **	0.087	0.68 ± 0.07	10.27 **	0.228
J6	3.87 ± 0.74	5.21 **	0.083			
WK9	2.62 ± 0.59	4.42 **	0.003			
A7	-12.33 ± 1.27	-9.72 **	0.031			
AMs	-8.72 ± 1.56	-5.58 **	0.021			
G81				0.27 ± 0.03	10.41 **	0.021
F6				0.32 ± 0.03	10.36 **	0.033
SSIIa				-0.27 ± 0.03	-8.06 **	0.001
G28				0.33 ± 0.04	8.81 **	0.005
AcPh				-0.48 ± 0.04	-11.44 **	0.060
intercept	76.66 ± 2.71	28.29 **		-0.54 ± 0.11	-4.74 **	
total eq	Y = 76.66 - 16.97(G4) - 1.94(M11) + 26.55(E30) - 2.40(M2CG) - 21.14(GPA) - 1.62(S3cl) + 19.01(P5) + 6.42(B1) + 13.45(CBG) + 3.87(J6) + 2.62(WK9) - 12.33(A7) - 8.72(AMs)			Y = -0.54 - 1.20(G4) - 0.14(M11) + 0.86(E30) - 0.38(M2CG) - 0.82(GPA) - 0.38(S3cl) + 1.09(P5) + 0.41(B1) + 0.68(CBG) + 0.27(G81) + 0.32(F6) - 0.27(SSIIa) + 0.33(G28) - 0.48(AcPh)		

** and *, significant at 1% and 5% level, respectively.



1.Koshihikari, 2.고품, 3.삼광, 4.일품, 5.추청, 6.동진, 7.신금오, 8.화성, 9.화청, 10.도봉, 11.삼남, 12.팔공, 13.Hitomebore, 14.백진주1호, 15.서농4호, 16.운누리, 17.만미, 18.기호, 19.금안, 20.낙동, 21.Hexi41, 22.삼덕

그림 8. 자포니카 22개 품종에서의 P5 서열 존재 여부. 1번 고시히카리와 13번 히토메보레(고시히카리 유래 품종)에서만 그 서열이 존재함을 확인.

(나) 'P5' 연관 염기서열의 염색체 위치 확인

P5가 위치하는 염색체 상의 위치를 알기 위하여 벼 염기서열 자포니카 기반 데이터베이스를 이용하고자 했으나, 기존의 데이터베이스에서 P5 분자표지의 염기서열을 찾을 수 없었다. 이 결과로 미루어 보았을 때, P5 염기서열은 모든 품종에 존재하는 것이 아닌 고식미 품종에만 존재할 것이라는 예측을 할 수 있었고, 고식미 품종으로 널리 알려진 일본의 고시히카리를 이용해 P5의 위치를 찾고자 하였다.

차세대 염기서열 분석 (Next generation sequencing) 기법을 이용해 P5 염기서열을 포함하는 contig를 검색하여 약 2kbp 정도의 고시히카리 특이적인 염기서열을 탐색하였다. 그 염기서열을 바탕으로 Chromosome walking을 통해 약 2.5kbp의 연장된 P5 염기서열을 확인하였고, 이를 기반으로 이 서열의 위치 추적을 시작하였다.

4개의 CSSL 집단(고시히카리/니폰바레//고시히카리, 고시히카리/*2 니폰바레, 고시히카리/IR64//고시히카리, 고시히카리/*2 IR64)으로 P5의 대략적인 위치를 찾고, 고시히카리/IR64 BC₁F₄ 집단에 실험실 보유 STS(Sequence-Tagged Sites)와 SSR(Microsatellite) 분자표지를 적용해 연관지도를 작성한 결과, P5 염기서열은 염색체 11번의 긴 팔에 위치함을 확인하였다. 그러나 위에서 밝힌 P5 연장 서열의 3' 방향은 11번 염색체 서열과 일치하지만 5' 방향은 11번이 아닌 12번 염색체 서열과 일치함을 보였다. 따라서 이 고식미 품종 특이적인 염기서열은 약 4.9kbp의 독특한 서열과 양 옆으로 니폰바레 서열의 copy가 복합적으로 연결되어 11번 염색체에 존재한다는 결론에 이르게 되었다 (그림 9).

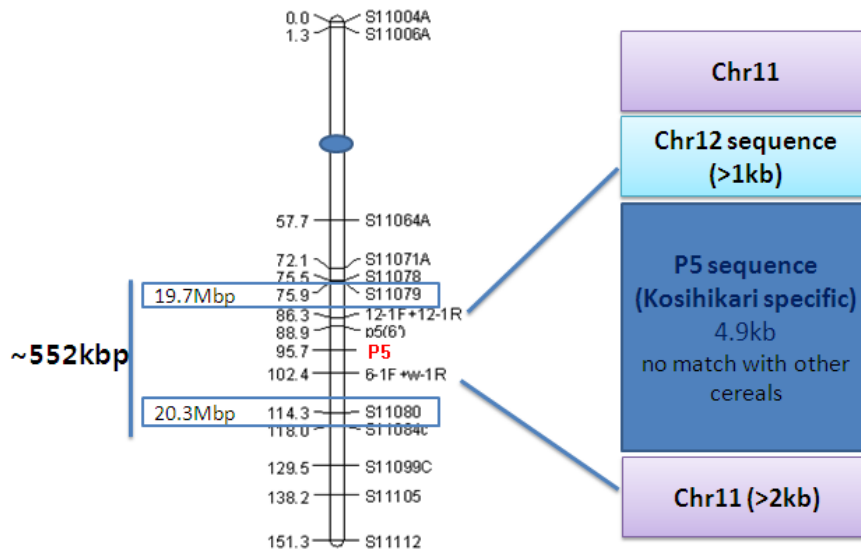


그림 9. 벼 11번 염색체 위의 P5 염기서열 위치 추정. 물리적 위치는 19.7Mbp에서 20.3Mbp 사이의 약 552kbp라고 추정되며 그 간격 안에 고시히카리 특이적 서열과 니폰바레 12번 염색체 서열의 일부, 11번 염색체 서열이 복합되어 있음.

(2) 고식미 품종 특이적인 염기서열의 기능 확인

약 4.9kbp의 고시히카리 특이적인 서열은 다른 작물에도 존재하지 않는 것을 확인하였고, 이 서열 안에 그간 밝혀지지 않은 새로운 유전자가 존재하는지 확인하기 위해서 구조적 예측을 실행하였다. 프로그램을 통한 예측 결과, 이 서열 안에 유전자의 구조가 두 군데 있음을 확인하였고, 이 결과를 바탕으로 분자마커를 제작해 고시히카리 cDNA를 재료로 하여 One-sided PCR을 수행하였다. 그 결과 예측된 유전자 두 개 중 하나에서 RNA 단편 서열이 확인되었고, 이는 새로운 유전자를 발견할 수 있는 가능성이 높아졌음을 시사한다. 현재 확인된 RNA 서열을 바탕으로 RACE 기법을 이용해 새 유전자의 완벽한 구조를 밝히기 위한 과정을 진행하고 있다.

(3) 고식미 품종 특이적인 염기서열의 유래 파악

현재까지 탐색한 P5를 포함하는 고식미 품종 특이적 염기서열을 아프리카 재배 벼의 일종인 *Oryza glaberrima*와 비교하였을 때, 특이적 염기서열 총 4.9kbp 중 약 4kbp 정도의 염기서열이 대부분 일치하였다. 이 결과를 바탕으로 문헌을 조사하여, *Oryza sativa*와

*Oryza glaberrima*가 분화할 때 MITEs(Miniature Inverted-repeat Transposable Element)가 삽입되었다는 가설이 존재함을 확인하였다(Zhu, Q. and Gel, S, 2005.) (그림 10). 따라서 P5를 포함하는 고식미 품종 특이적 염기서열이 일종의 TE(Transposable Element)를 암호화하는 염기서열일 것이라 예측하고 있다. 이는 재배벼의 종분화와 관련해서도 의미 있는 연구 근거가 될 수 있을 것이라 기대된다.

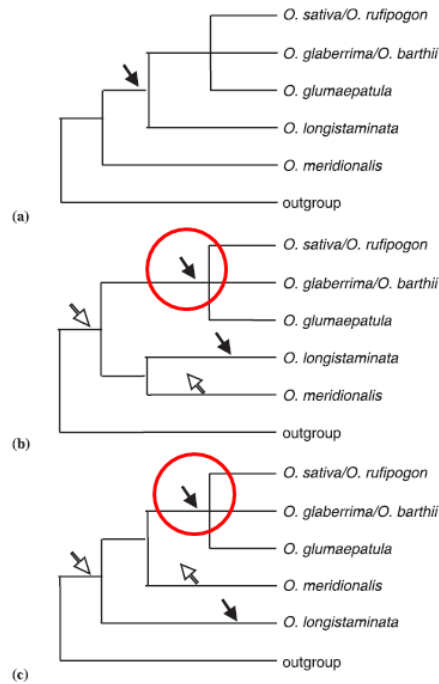


그림 10. Zhu, Q. and Gel, S. (2005)의 논문에 제시된 벼의 A-genome 종의 분화를 설명하는 세 가지 가설. 두 번째와 세 번째 가설에 의하면 *O. sativa*와 *O. glaberrima*의 분화에는 MITEs(Miniature Inverted-repeat Transposable Element)의 삽입이 진화적 사건으로 작용했을 것임을 나타냄.

고시히카리 특이적인 P5 분자표지의 유래를 확인하기 위하여 고시히카리 품종의 계보를 탐색하였다. 고시히카리의 모본과 부분인 농립1호(Norin1)와 농립22호(Norin22)의 DNA를 추출해 P5 분자마커로 PCR를 수행한 결과, 농립1호에서만 P5 산물이 증폭되는 것을 확인하였다 (그림 11). 이를 통해 고시히카리 특이적 염기서열은 농립1호에서 유래된 것을 알 수 있었고, 추후에 농립1호 유래 품종에서도 고시히카리 특이적 염기서열을 확인해 볼 계획이다.

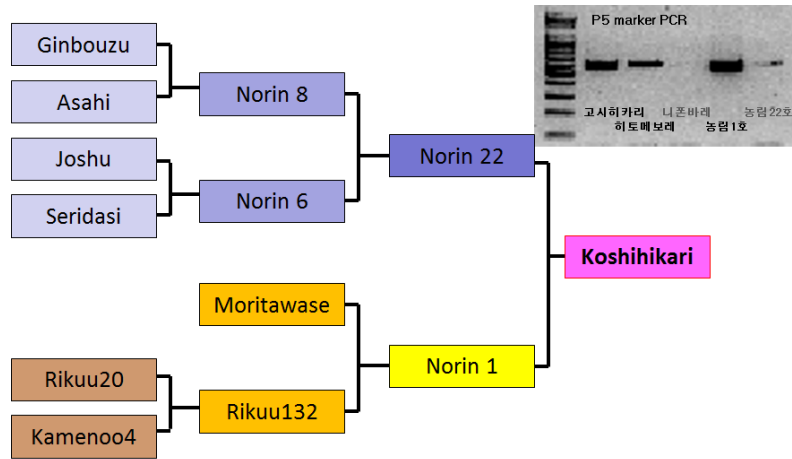


그림 11. 고시히카리 품종 계보 및 고시히카리 모본, 부분의 P5 분자마커 PCR 증폭 결과. P5 분자마커로 PCR을 수행한 결과, P5를 포함하는 고시히카리 특이적 염기서열은 농림1호로부터 유래된 것으로 확인됨.

다. 저 단백질 staygreen 돌연변이체의 계통 육성 및 선발

staygreen 돌연변이 계통의 농업형질을 직접 유래품종인 화청찰 계통과 기본 품종인 화청벼와 비교하여 표4에 제시하였다. staygreen 계통은 화청찰벼 계통에서 유기시킨 것으로서 유래품종인 화청찰벼와 기초 작물학적 형질 및 수량구성요소에서 별 차이가 없었다. 종자(현미)의 크기와 모양도 매우 유사하여 유래품종과 구별이 안 되었다. 단지 staygreen 특성은 등숙기 동안이나 완숙 후에도 엽록소가 파괴되지 않음으로써, 지상부 식물체에 높은 질소 함량을 유지하는 반면에 종실에는 상대적으로 낮은 질소함량을 보였다(그림12). 쌀의 단백질 함량은 식미에 영향을 미치는 중요한 요인으로서 단백질 함량이 낮을수록 식미가 우수해지며 식었을 때에도 식미가 오래 유지되는 특징이 있다. 따라서 이 staygreen 특성을 중요한 벼 품종에 도입하여 식미가 우수한 품종을 육성하고자 하였다.

	Heading Date	Culm length(cm)	Panicle length(cm)	Panicles/hill(No.)	Spikelets/panicle(No)	Fertility (%)	1000gr. wt.(mg)	Yield/hill(g)
Hwacheongbyeo	8. 17	89.0	19.7	17.3	129.0	92.9	21.7	45.0
Hwacheong-wx	8. 18	93.7	21.4	17.0	123.7	91.2	20.3	42.0
Staygreen Mutant	8. 18	93.3	20.8	17.5	129.5	92.7	20.5	43.0

Lines	Brown rice			
	Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	L/W
Hwacheong	4.8	2.8	1.95	1.72
Hwacheong-wx	4.7	2.7	1.93	1.74
Mutant	4.7	2.7	1.93	1.72
Difference	ns	ns	ns	ns

표 4. staygreen 돌연변이체의 작물학적 특성.

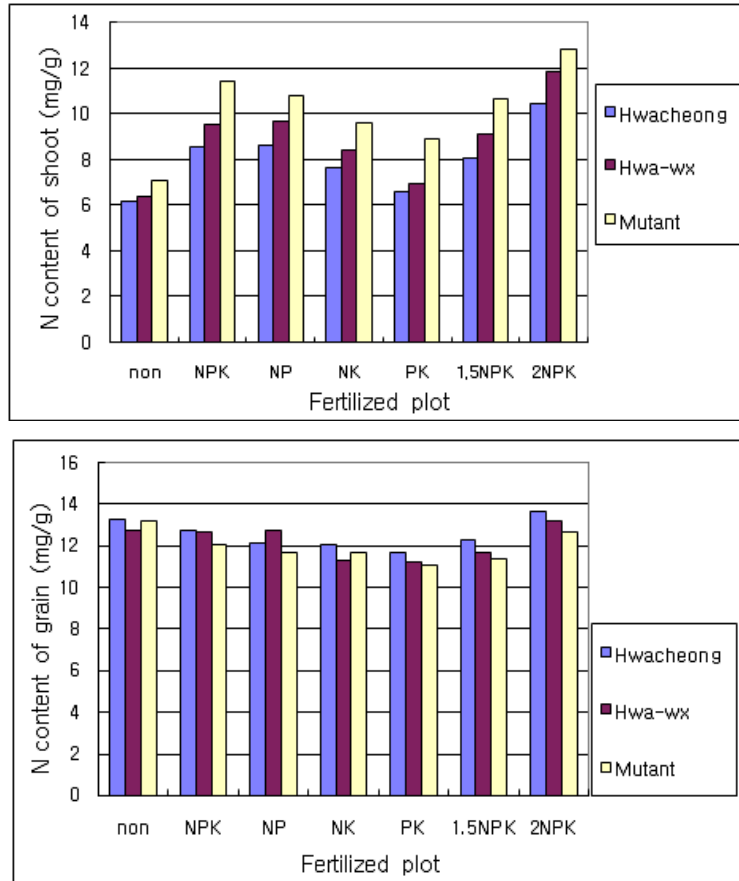


그림 12. staygreen 돌연변이 계통의 지상부 식물체 질소함량(위)과 현미의 질소함량(아래).

[non= no fertilizer, NPK= 10-8-8 kg/10a, NP= 10-8-0 kg/10a, NK= 10-0-8 kg/10a, PK= 0-8-8 kg/10a, 1.5NPK=15-12-12 kg/10a, 2NPK=20-16-16 kg/10a]

1년차에 staygreen 변이체와 일품, 삼광, 고품, 양조벼, 밀키퀸 등과 같은 품종들을 교배하여 F₂를 양성하고 이중에서 staygreen 특성을 가진 우수 개체들을 선발하여 2010년도부터 2012년도까지 F₅를 전개하였다(표5). 2012년도에 F₅를 전개하였으나, 수량과 초형이 불량하여 선발에서 모두 도태 시키게 되었고, 다시 staygreen 변이체와 주요 고식미 품종들을 교배하여 F₂를 재 양성하였다. 추후 미질 다양화와 식미 개선을 목적으로 집단을 다시 전개하면서 식미 관련 형질을 조사하고 우수 식미 품종을 육성할 수 있는 좋은 자료로 사용할 것이다. 이 외에 별도로 staygreen을 이용한 고세대 계통들을 개발해 온 바, 그들의 수량을 검정하였고, 그 결과는 표6과 같다.

	entry	교배 번호	교배 조합	선발 개체수	교배 목적
2009 F2	990136	HP9799	sgr고수량계통/밀키퀸	19	미질 다양화
	990138	HP9801	서금벼/sgr고수량계통	13	식미 개선
	990142	HP9805	삼광/sgr고수량계통	16	식미 개선
	990143	HP9806	고품/sgr고수량계통	10	식미 개선
	990144	HP9807	일품/sgr고수량계통	11	식미 개선
	990145	HP9808	히토메보레/sgr고수량계통	9	식미 개선
	990149	HP9812	양조벼/sgr고수량계통	12	미질 다양화
	계		7개 조합	90	
2010 F3	300139-300157	HP9799	sgr고수량계통/밀키퀸	24	미질 다양화
	300158-300170	HP9801	서금벼/sgr고수량계통	21	식미 개선
	300198-300213	HP9805	삼광/sgr고수량계통	15	식미 개선
	300214-300223	HP9806	고품/sgr고수량계통	14	식미 개선
	300224-300234	HP9807	일품/sgr고수량계통	15	식미 개선
	300235-300243	HP9808	히토메보레/sgr고수량계통	18	식미 개선
	300257-300268	HP9812	양조벼/sgr고수량계통	18	미질 다양화
	계		7개 조합	125	
2011 F4	310144-310156	HP9799	sgr고수량계통/밀키퀸	8	미질 다양화
	310157-310166	HP9801	서금벼/sgr고수량계통	13	식미 개선
	310203-300213	HP9805	삼광/sgr고수량계통	12	식미 개선
	310214-310217	HP9806	고품/sgr고수량계통	0	식미 개선
	310218-310223	HP9807	일품/sgr고수량계통	6	식미 개선
	310224-300230	HP9808	히토메보레/sgr고수량계통	9	식미 개선
	계		6개 조합	48	
2012 F5	321373-321380	HP9799	화청wx-B-24-8//TR22183/밀키퀸	6	품질 다양
	321381-321391	HP9801	서금//화청wx-B-24-8/TR22183	6	고식미
	321432-321435	HP9805	삼광//화청wx-B-24-8/TR22183	6	고식미
	321436-321441	HP9808	Hitomebore//화청wx-B-24-8/TR22183	3	고식미
	계		5개 조합	21	

표 5. 미질 개선과 다양화를 위한 staygreen계통 교배 및 선발

계통명	교배 조합	간장 (cm)	수장 (cm)	수수 (개)	천립중 (g)	10a수 량(kg)
녹원찰		82.2	19.2	11.7	22.9	458.7
HP5568A1-1-2-1-2-3-1-4-2-1-1-2-1	stay-green/길립흑미	80.8	21.4	7.5	23.1	323.6
일품		65.2	21.2	9.8	27.3	506.5
화청		86.3	19.3	13.4	26.8	459.5
HP7380-4-1-3-6-2-3	HP5576(stay-green/indica-like)/서농10호	80.6	19.7	9.0	15.0	208.2
HP5575A1-10-2-2-2-2-1-1-2-1-1-2-2	stay-green/SLG	102.0	23.2	7.2	65.8	391.1
HP5576A1-2-2-1-2-1-2-1-2-2-2-2-1	stay-green/Indica-like	79.2	20.7	8.0	23.7	428.2
일품		73.8	21.7	15.0	28.0	615.2
M001(sg M-B)-5-B-2-1-2-B-B-B		70.5	20.8	11.0	27.4	412.1
A18-6-1-2-1-1-1-3-2-1-2-1	stay-green/일품	80.0	21.2	13.7	26.4	409.4
삼광		72.3	18.8	10.4	19.3	487.6
일품		69.2	19.8	13.6	27.1	511.2
A18-6-1-2-1-1-1-3-2-1-2-1-2-2-1-1(G)	stay-green/일품	75.2	21	9.6	26.1	436.9
M001(sg M-B)-31-1-1-1-1-2-2-2-2-2-3-3(G)-1(G)		80	19.3	9.8	28.4	401.9

표 6. staygreen 계통 생산력 검정 결과

라. 벼 식미 예측을 위한 마커 세트의 개발

(1) 자포니카 벼 식미 예측 마커의 추가 개발 및 개량

(가) 마커 개발을 위한 후보 유전자의 SNP 확인

선행 연구 (Lestari *et al.*, 2009)에서 식미에 영향을 주는 것으로 밝혀진 여러 후보 유전자들 가운데 4개 유전자 (Sucrose synthase 3, UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylase, Phosphoserine phosphatase, 6-Phosphofructokinase 2)를 선택하여 마커 개량을 시도하였다. 자포니카 품종들에서 각 유전자의 염기서열 분석을 수행하였고, 그 결과 S3c, AcPh, PP, P-Fruc 유전자에서 각각 T/G, T/G, A/G, A/G의 염기 변이가 있다는 것을 확인하였다 (표 7, 그림 13).

표 7. 식미에 영향을 주는 QTL에 기초한 후보 유전자 선택 및 primer 서열 정리

Basic primer name	Candidate gene	Chr	Contig	QTL position	Position of product at genome (bp)		QTL source	Primer sequences	Estimated product size (bp)	SNP
					Start	End				
S3c	Sucrose synthase 3 (LOC_Os07g42490)	7	AP004988	RM234-RM47	25427790	25428733	Kwon <i>et al.</i> (2007)	F: 5'-GCAAACTG CCAAGAAAGAG-3' R: 5'-ACATTGCCAT GACATTGGA-3'	963	T/G
AcPh	UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylase (LOC_Os08g10600)	8	AP003875	RM547-RM72	6233 988	6234836	Kwon <i>et al.</i> (2007)	F: 5'-GCGCTTCGTTA TTGTTGGAG-3' R: 5'-TGGTAACTGG GCACAGGATT-3'	849	T/G
PP2	Phosphoserine phosphatase (LOC_Os12g31820)	12	AP003727	RM1246	19119527	19120418	Wada <i>et al.</i> (2008)	F: 5'-TTTGAATAGGT CCACTGCTTAG-3' R: 5'-CCATGCATCTCAT TAGTCAAAGT-3'	981	A/G
PFruc	6-Phosphofructokinase 2 (LOC_Os01g09570)	1	AP002743	-	4902825	4903704	Genomic data base	F: 5'-CTTCTTCTCGG GTGTCTCG-3' R: 5'-TGTTAAGTCCAG GCGAGAGG-3'	880	A/G

PP										
Koshihikari	61	ATTTCAAAAAAATTGGAAGA	ACTAAGGAAGGTTGTGGCAAGAAATATTT	G	ATCCATATTT	120				
Samwang	61	ATTTCAAAAAAATTGGAAGA	CAAAAGGAAGGTTGTGGCAAGAAATATTT	G	ATCCATATTT	120				
Hwaseong	61	ATTTCAAAAAAATTGGAAGG	ACAAAGGAAGGTTGTGGCAAGAAATATTT	A	ATCCATATTT	120				
Nipponbare	61	ATTTCAAAAAAATTGGAAGG	ACAAAGGAAGGTTGTGGCAAGAAATATTT	A	ATCCATATTT	120				
Dobong	61	ATTTCAAAAAAATTGGAAGA	CAAAAGGAAGGTTGTGGCAAGAAATATTT	G	ATCCATATTT	120				
Gopum	61	ATTTCAAAAAAATTGGAAGA	CAAAAGGAAGGTTGTGGCAAGAAATATTT	A	ATCCATATTT	120				*
S3c										
Nipponbare	121	TCATTC	T GTTTATTC	ACTGAAAACATTTGTCCATTCAATGGACTCATAAACTGCTGTGT	180					
Gopum	121	TCATTC	T GTTTATTC	ACTGAAAACATTTGTCCATTCAATGGACTCATAAACTGCTGTGT	180					
Koshihikari	121	TCATTC	T GTTTATTC	ACTGAAAACATTTGTCCATTCAATGGACTCATAAACTGCTGTGT	180					
Dobong	121	TCATTC	T GTTTATTC	ACTGAAAACATTTGTCCATTCAATGGACTCATAAACTGCTGTGT	180					
Palkong	121	TCATTC	T GTTTATTC	ACTGAAAACATTTGTCCATTCAATGGACTCATAAACTGCTGTGT	180					
Dongjin	121	TCATTC	G GTTTATTC	ACTGAAAACATTTGTCCATTCAATGGACTCATAAACTGCTGTGT	180					*
AcPh										
Nipponbare	361	ATTATTTT	TACTTATTT	TAGTACTATATAGCTAAC	T	TACTAACTTTAAAGAAAAGGAC	420			
Koshihikari	361	ATTATTTT	TACTTATTT	TAGTACTATATAGCTAAC	T	TACTAACTTTAAAGAAAAGGAC	420			
Hwaseong	361	ATTATTTT	TACTTATTT	TAGTACTATATAGCTAAC	T	TACTAACTTTAAAGAAAAGGAC	420			
Dobong	361	ATTATTTT	TACTTATTT	TAGTACTATATAGCTAAC	T	TACTAACTTTAAAGAAAAGGAC	420			
Samnam	361	ATTATTTT	TACTTATTT	TAGTACTATATAGCTAAC	T	TACTAACTTTAAAGAAAAGGAC	420			
Gopum	361	ATTATTTT	TACTTATTT	TAGTACTATATAGCTAAC	G	TACTAACTTTAAAGAAAAGGAC	420			*
PFruc										
Giho	121	TTT-CCCGCTCTTTTGGGGATGTTTTTTTTGGCCTGTGTTTGGTTCAGGTCATCCC	A	ATTC	179					
Nipponbare	121	TTT-CCCGCTCTTTTGGGGATGTTTTTTTTGGCCTGTGTTTGGTTCAGGTCATCCC	A	ATTC	179					
Dobong	121	TTT-CCCGCTCTTTTGGGGATGTTTTTTTTGGCCTGTGTTTGGTTCAGGTCATCCC	A	ATTC	179					
Chucheong	121	TTT-CCCGCTCTTTTGGGGATGTTTTTTTTGGCCTGTGTTTGGTTCAGGTCATCCC	A	ATTC	179					
Koshihikari	121	TTTTCCCGCTCTTTTGGGGATGTTTTTTTTGGCCTGTGTTTGGTTCAGGTCATCCC	G	ATTC	180					
Gopum	121	TTTTCCCGCTCTTTTGGGGATGTTTTTTTTGGCCTGTGTTTGGTTCAGGTCATCCC	G	ATTC	180					*

그림 13. 여섯 가지 자포니카 품종에서의 PP, S3c, AcPh, PFruc 유전자 서열의 일부 비교. 특정 위치에서의 SNP를 볼 수 있음.

(나) SNP에 기반한 CAPS/dCAPS/SNAP 마커 개발

위에서 밝힌 SNP 부분에 CAPS/dCAPS 마커를 디자인하여, 최종적으로 하나의 CAPS 마커와 세 개의 dCAPS 마커를 개발하였다. 이는 기존 식미 마커 세트 (Lestari *et al.*, 2009)에 추가될 수 있는 새로운 마커로, 더욱 정교한 식미 예측에 이용될 수 있다.

CAPS/dCAPS 마커는 PCR에 기반하여 쉽게 이용이 가능하지만, 제한효소가 필요하다는 점에서 비교적 비용과 시간이 많이 드는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 새롭게 개발한 4개의 마커를 SNAP 마커로 개량하고자 하였다 (표 8). 4개의 유전자에서 각각 T, A specific primer를 새롭게 제작하였고, 이는 CAPS/dCAPS 마커의 결과와 같았다 (그림 14). 본 연구는 식미와 관련된 새로운 마커 개발 및 개량의 가치를 인정받아 저널에 게재되었으며, 이는 식미와 연관된 연구에서 대량의 샘플 분석 및 식미의 수치화에 큰 도움을 줄 것이라 생각된다.

Original primer	Sequence	Primer type	SNAP primer name	Sequence	PCR condition of SNAP primer
AcPh	F:AGTTGTGGTT TAAGCATAG	dCAPS/ <i>MseI</i>	AcPh-T	F:TCAGGTATGCCTGC ATATGTTTACTTT	94 °C 5min 94 °C 30sec 63 °C 1min
	R:ATTGCCTTTTCT TTAAAAGTTTATTA			R:CACACAATTGCCTTTT CTTTAAAAGTTTACTAA	
PFruc	F:CTTCTTCTTCG GGTGCTCTCG	dCAPS/ <i>EcoRI</i>	PFruc-A	F:GGCCTGTGTTTGGT TCAGGTCATCCTA	94 °C 5min 94 °C 30sec 62 °C 1min
	R:TGTTAAGTCCAG GGCAGAGG			R:ACGAGGAGAATTCTTAC TTGACGACTGAATAAGC	
S3cII	F:TTCCATGATGTG CCTACTCTC	dCAPS/ <i>TaqI</i>	S3cII-T	F:CATCCAAATTCTGTTTAT TTATTCAAAAATCATCCT	94 °C 5min 94 °C 30sec 64 °C 1min
	R:GGACAAATGTTTT CAGTGAATAAAAT			R:AGTAAATGCACTCTTTAT CCAGCTAACATCAGCA	
PP2	F:TTTGAATAGGTC CACTGCTT	CAPS/ <i>MseI</i>	PP2-A	F:AAGAACAAAGGAAGGT TGTGGCAAGAAATATTA	94 °C 5min 94 °C 30sec 63 °C 1min
	R:CCATGCATCTCA TTAGTCAA			R:CAGCAACATGGCAGAGT GGAGAGTTAAAA	

표 8. CAPS/dCAPS/SNAP의 primer 서열 및 증폭 조건.

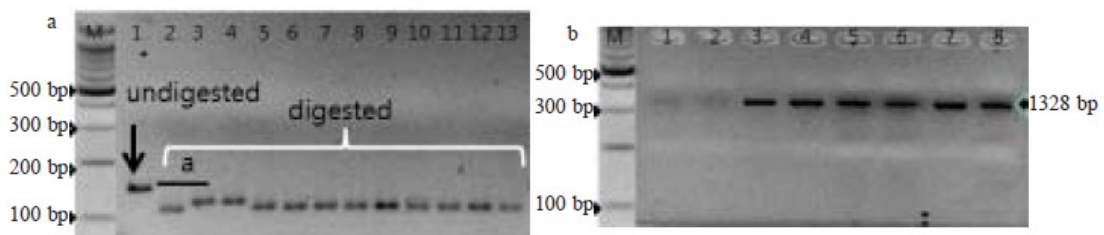


그림 14. AcPh locus의 dCAPS와 SNAP primer의 DNA band 패턴. (a) dCAPS-AcPh primer의 band 패턴. 3-4번은 G allele을, 나머지는 T allele을 가짐. 1. 고시히카리, 2. 고시히카리, 3. 삼광, 4. Rojolele, 5. 고품, 6. 도봉, 7. 팔공, 8. 동진, 9. 삼남, 10. 기호, 11. 추청, 12. Ciliwung, 13. Kalimutu. (b) AcPh-T primer의 band 패턴. 1. 삼광, 2. Rojolele, 3. 고품, 4. 고시히카리, 5. 도봉, 6. 동진, 7. 삼남, 8. 기호.

(2) 인디카 벼에서의 식미 예측 마커 세트 개발

(가) 새로운 식미 관련 마커의 개발

자포니카 벼는 우리나라를 비롯한 북동아시아에서 대부분 재배·소비되는 반면, 인디카 벼는 동남아시아 국가를 포함한 전 세계적으로 재배되고 있다. 인디카 벼는 외형뿐만 아니라 질감, 점도 등의 성질이 자포니카와 상이하여, 자포니카와는 구별되는 새로운 식미 예측 마커의 개발을 필요로 한다.

본 연구에서는 24개 인디카 품종과 23개의 인도네시아 local accession을 이용하여 인디카에 적용 가능한 식미 예측 마커 세트를 개발하고자 하였다. 그 첫 번째 단계로, 기존에 식미와 관련이 있다고 연구된 QTL 및 전분합성과 관련된 유전자를 genomic database (DB)에서 검색하여 그 유전자를 대상으로 8개의 마커를 추가로 개발하였다. 그 결과 인디카 벼의 식미를 평가하는데 총 54개의 마커를 이용할 수 있었다(표 9).

표 9. 인디카 식미와 연관된 기개발 및 새로 개발한 마커 목록

PCR marker	Marker type	Chr ^a	Sequence	
			Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Ohtsubo et al. (2002; 2003); Ohtsubo & Nakamura (2007)				
A6	STS	7	CCAGCTGTACGCCTGTACTAC	CCAGCTGTACGTCTTCCCCAGC
A7	STS	12	TGCCTCGACCAGAAATAG	TGCCTCGACCATGAG
B1	STS	11	GTTTCGCTCCTACAGTAATTAAGGG	GTTTCGCTCCCATGCAATCT
B43	STS	9	GGCCGGCATGACTCAC	ACTGGCCGGCATCAAGAC
F6	STS	4	ACCACTCCATATATATCATCCAAAG	ACCACTCCATATCACCACAAGG
G4	STS	1	GAGACCGATATGCGATTC	GTGGTGTTTAGATCCAGAGACTTA
G22	STS	9	CTCACTCAAATTTACAGTGCATTTTCTTG	AGGGCCATGATACAAGACTCTGT
G28	STS	1	GGCGGTCGTTCTGCGAT	GGAGAATCCACAGTAAGTTTTTCTTTG
J6	STS	11	GTCGGAGTGGTCAGACCG	GTCGGAGTGGATGGAGTAGC
M2CG	STS	8	ACAACGCCTCCGATGA	ACAACGCCTCCGACAACAAGAT
M11	STS	6	GTCCACTGTGACCACAACAT	GTCCACTGTGGGGATTGTTC
P5	STS	10	ACAACGGTCCGTCCTTGCTT	ACAACGGTCCAACAGATACTTTTGA
S13	STS	1	GTCGTTCCCTGTGGTTAGGACAGGGT	GTCGTTCCCTGCTGGTGTCTCAGAT
T16	STS	12	GGTGAACGCTGTAGTTGGAATATA	GGTGAACGCTCAGATTTAAATATAAT
WK9	STS	9	CCCGCAGTTAGATGCACCATT	CCGCAGTTAGATCAAGTGCC
E30	STS	1	TACCTGGTTGATGTATACAGATCTGGT	ATCCCTCGATCCCTCTAGCATTAT
B7	STS	2	CAGGTGTGGGTTACAAGGATGA	CAGGTGGTTCACGGCCTTT
G49A	STS	11	AATCCAGACATGAAATTTATATGCAGAT	AATCCAGACATGTTGTCTCAATTTTTG
G81	STS	6	TACCTGAACCAGCAAGCATGCGCG	TACCTGAACCAGTATAATCTTTG
P3	STS	5	AACGGGCCAAAACGGAGGT	AACGGGCCAACGCAG
Bao et al. (2006a, 2006b)				
Wx (SNP)	CAPS/AccI	6	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	TTTCCAGCCCAACACCTTAC
SS1 (SSR)	SSR	6	GATCCGTTTTTGTGTGCCC	CCTCTCTCCGCCGATCCTG
SBE1 (SSR)	SSR	6	ATTTCTTTGGCCACAGGCGA	CCCAGATTCGGAACAAGAAC
SBE1 (STS)	STS	6	GAGTTGAGTTGCGTCAGATC	AATGAGGTTGCTTGTCTGCTG
SBE2 (SNP)	dCAPS/SpeI	2	GTCTTGACTCAGATGCTGGA	ATGTATAACTGGCAGTTCGAACGG
SSIa	SNP	6	F7:CTGGATCACTTCAAGCTGTACGAC F22:CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC	R1:GCCGGCGGTGAGATCTTAAC R21:ACATGCCGCGCACCTGGAAA

Lestari et al. (2009)

S3cI	Indel	7	CCACTCTCATGTCCTTGAAC	GCCATGACATTTGGACAT
S3cII	dCAPS/TaqI	7	TTCATGATGTGCCACTCTC	GGACAAATGTTTTTCAGTGAATAAA <u>T</u>
TreB	Indel	7	CACTCCAGTTCCTGCTCAAA	CACCTCCAAAACGAATATGG
AMs	SSR	2	CTTCCAAGGACCCCATCCT	CCCAACATCTCCGTCAGAAT
GPA	SSR	11	CCAAATACGCGGCCCTTCT	AGTTTCTGGGCTCGGAGGA
GBSS1	SSR	6	CAAATAGCCACCCACACCAC	CTTGCAGATGTTCTTCCTGATG
AcPh	dCAPS/MseI	8	AGTTGTGGTTTAAGCATAGG	ATTGTCCTTTTCTTTAAAGTTTA <u>T</u> TA
CBG	SSR	10	AGCTTCCCTAATGGCTTCGT	ATTTGCCAACTTTTGGATGG
SH51	dCAPS/SpeI	1	ATTCTTGATGAAAATAATTA <u>A</u> CTAG	GGTTAACCATCTTATAAAAATTTGTC

He et al. (2006)

SS1 (STS)	STS	6	TCTAGATTGCTACACGTGAGAGG	TCTCCACGATAAECTCCACC
SBE3 (STS)	STS	2	TCGGTCAATTTCGGTTAGTCTCCTC	ACATCCTCTAGCATACTGGCGACTC
SssIIa	STS	6	TCTAGATTGCTACACGTGAGAGG	GGAGCCACCTGTAAAGCGTG
Isa	STS	8	CCTGTCTTGACACGTGCGGTA	GCACGGTTCTGATGTACGAGAG
Pul3(3'end)	STS	4	GGGTTCGCTTTCACAACACAG	GTCACGACATAAGAGAAGCTGC
Pul5(5'end)	STS	4	AGTTCGCTAGTCATCTGCTCG	CCACATGTCCTTGCTCCACTT

Zeng et al. (2007)

P2	STS	10	ATTAGCCGGTAAATGGATGAGTTC	AAGCAATACTAATCCCTCCAAACC
P3A	STS	10	AATCCAACGCATCAAGGCTGGC	ACAATGCCAAACACCAGGAECTCG
P4	STS	10	TGAGCTTTACCTCCCTCCTAACC	TCCACCTTTCTCTCATCCAC
P7	STS	10	AGTTAAACAACCTCCCCACTGC	GGGTAGGATAGGGGATAAGGAGC

Kobayashi et al. (2008)

KA43	SSR	2	CCTTTCTGAATGCGGAATTT	GAAATGATGGCATGGGAGAT
------	-----	---	----------------------	----------------------

This study

MAD ^b	STS	12	TAACAACCACGGCCGAGAA	GAGCGTCTTTTCTTTTCGGTA
HP ^b	STS	3	TGGAGGAGATGTACGTCGAG	GAAGTCGAGGTGGTCCATGA
PP2 ^b	CAPS/MseI	12	TTTGAATAGTCCACTGCTT	CCATGCATCTCATTAGTCAA
PFruc ^c	dCAPS/EcoRI	1	CTTCTTCTCGGGTGTCTCG	TGTTAAGTCCAGGGCAGAGG
Aglu ^c	STS	1	CCTCTGGAATCTTGCTATTTAGG	ATCCGCTAGATCACTGACAAA
LDS ^c	STS	1	CGAGGAGACAGACAGCATCA	GATGCAGCAGCCATGAGTT
BE2 ^c	CAPS/SpeI	2	GCCCCGAACATGATTCTA	GGCTTTACCGACCTTACTGT
BE6 ^c	dCAPS/HphI	6	TACCCAGTTAAGTGTCTGTAAAG <u>G</u>	GAAGAGAGCGCAAGAATCCATTGTT

^aChr: chromosome location.

^bMarkers developed from the candidate genes residing QTL regions identified by Wada et al. (2007): MAD, OsMAD20 MADS box family; HP, *Homeobox domain containing protein*; PP2, *Phosphoserine phosphatase*.

^cMarkers developed from randomly chosen candidate genes based on their potential association with palatability by their functions: PFruc, *6-phosphofructokinase 2*; Aglu, *Acyl UDP N acetylglucosamine O acyltransferase*; LDS, *Lipid A disaccharide synthase*; BE2, *1.4 alpha-glucan branching enzyme IIB*; BE6, *1.4 alpha-glucan branching enzyme*.

(나) 인디카 벼의 식미 관련 형질 측정

식미를 결정하는 이화학적 특성에 기초한 세부 항목을 나누어 24개 인디카 품종의 식미 특성을 조사한 결과, 예상했던 바와 같이 그 변화폭이 큰 것을 확인할 수 있었다 (표 10). 식미관련 형질간의 회기분석을 수행한 결과, ST와 PC는 유의하게 상관이 있는 것으로 나타났고, AC는 ST, PC와 특별한 상관을 보이지 않았다 (표 11).

표 10. 인디카 품종에서 측정된 식미관련 요소의 평균 값 및 범위

Parameter ^a	Mean±SD ^b	Range	CV(%)	Skewness	Kurtosis
ST	3.69±0.49**	2.2-4.25	13.25	-1.47	2.3
AC (%)	21.38±2.33**	16.63-26.51	10.91	0.05	-0.07
PC (%)	8.84±1.40**	5.53-10.33	15.83	-1.08	0.14
PV ^{RVU}	219.64±41.09**	124.16-305.03	18.71	-0.58	0.68
HPV ^{RVU}	127.58±21.10**	91-169.1	16.54	-0.04	-0.6
BDV ^{RVU}	92.06±15.83**	32.91-150.08	28.06	-0.27	0.72
CPV ^{RVU}	255.24±38.53**	142.08-323.31	15.10	-0.74	2.09
SBV ^{RVU}	35.6±10.02**	-26.25-100.75	40.71	-0.33	0.15
CTV ^{RVU}	127.66±25.45**	31.06-172.45	19.94	-2.03	8.05

^a ST, palatability score from sensory test; AC, amylose content; PC, protein content; CPV, cold paste viscosity; BDV, breakdown viscosity; PV, peak viscosity; HPV, hot paste viscosity; SBV, setback viscosity; CTV, consistency viscosity; M, palatability value estimated from the equation based on marker data; RVU, Rapid Visco Unit. ^b**significant at level of 1%.

표 11. 인디카 품종에서 측정된 식미관련 요소간의 correlation matrix

Parameter	ST	AC	PC	PV	HPV	BDV	CPV	SBV
ST								
AC	-0.324 ^{ns}							
PC	0.412*	-0.262 ^{ns}						
PV	0.249 ^{ns}	-0.343 ^{ns}	0.318 ^{ns}					
HPV	0.077 ^{ns}	-0.116 ^{ns}	0.222 ^{ns}	0.845**				
BDV	0.333 ^{ns}	-0.450*	0.324 ^{ns}	0.900**	0.528**			
CPV	-0.193 ^{ns}	0.381 ^{ns}	0.189 ^{ns}	0.496*	0.769**	0.161 ^{ns}		
SBV	-0.400*	0.718**	-0.0144 ^{ns}	-0.549**	-0.127 ^{ns}	-0.769**	0.453*	
CTV	-0.378 ^{ns}	0.657**	0.100 ^{ns}	0.049 ^{ns}	0.328 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	0.856**	0.773**

^a ns, not significant at the 5% level; * and **, significant at 5 and 1% level, respectively.

(다) 마커를 통한 인디카 벼의 식미 예측 모델 구축 및 확인

54개의 마커를 인디카 품종을 이용하여 모두 검정한 결과, 그 중 18개의 마커가 식미와 매우 유의한 상관을 보이는 것을 확인하였다 (R^2 : 0.997, 표 12). 이 18개의 식미 마커로 회기식을 만들어 인도네시아 accession에 적용했을 때, 식미 마커로 예상한 식미치와 실제 식미치가 매우 높은 상관을 보였다 ($r=0.805^{**}$, 표 13). 본 연구는 수치화하기

힘든 식미치를 분자 마커를 이용해 높은 정확도로 수치화 한 세계 최초의 시도이며, 자포니카 벼와 더불어 식미를 측정하기 까다로운 인디카 벼까지 전 세계 재배벼의 식미를 간단히 예측할 수 있게 되었다는 점에서 그 의미가 크다. 이 연구 결과는 추후 MAS를 이용한 고식미 품종 육종에 일조할 수 있을 것이라 기대된다.

표 12. 다중회기분석에 근거한 인디카 벼 식미 예측 모델

PCR primer	Palatability by sensory test (ST)		
	Parameter estimated	t-value	R ²
A7	-3.26±0.21	-15.85**	0.074
E30	-0.33±0.05	-6.78**	0.045
F6	0.65±0.05	13.76**	0.029
S13	0.13±0.04	3.20*	0.010
T16	6.11±0.25	24.27**	0.029
WK9	1.00±0.06	16.69**	0.048
P3	-0.23±0.03	-6.58**	0.01
GPA	2.36±0.11	22.23**	0.32
AcPh	0.27±0.04	5.91**	0.048
Pul3	1.62±0.08	18.92**	0.001
CBG	-0.85±0.05	-18.27**	0.060
S3cI	-0.53±0.07	-7.45**	0.010
GBSS1	0.42±0.04	10.01**	0.0001
SS1	-3.20±0.15	-21.80**	0.167
SBE2	-0.52±0.05	-9.69**	0.012
P3A	0.45±0.07	6.48**	0.008
P4	0.97±0.08	11.65**	0.032
HP	-0.81±0.06	-13.90**	0.094
Intercept	3.07±0.12	26.49**	
Total			0.997
Equation	$Y = 3.07 - 3.26(A7) - 0.33(E30) + 0.65(F6) + 0.13(S13) + 6.11(T16) + 1.00(WK9) - 0.23(P3) + 2.36(GPA) + 0.27(AcPh) + 1.62(Pul3) - 0.85(CBG) - 0.53(S3cI) + 0.42(GBSS1) - 3.20(SS1) - 0.52(SBE2) + 0.45(P3A) + 0.97(P4) - 0.81(HP)$		

표 13. 23개 인도네시아 local accession의 sensory test 값과 식미 예측 값의 비교

Accession name	Palatability value by	
	Sensory test (A)	Regression equation (B)
Abang Busur	2.27	2.12
Cantik Manis	2.57	3.46
Ceru	2.35	1.89
Dayang Rindu	2.45	3.12
Gedagai Hitam	2.74	1.89
Merong	2.58	3.44
Padi Merah	3.32	4.25
Palao Bunan	2.53	3.45

Accession name	Palatability value by	
	Sensory test (A)	Regression equation (B)
Palawak Manur	2.26	1.98
Peria	2.60	3.12
Reket Abang	2.37	1.81
Reket Bideng	3.23	4.09
Reket Bideng Bayan	3.06	3.12
Reket Bontok	3.19	3.67
Reket Bune	2.60	3.64
Reket Sentul	2.61	2.70
Sango	2.29	2.42
Santang	3.42	4.06
Seluang	2.49	2.89
Serendah	2.04	1.89
Siam Mayang	2.20	2.41
Siam Saba	3.16	3.77
Sukung	2.22	1.92
Correlation between A and B	$r = 0.805^{**}$	

(3) 자포니카 식미 판별 마커 개량 및 검증

(가) 식미 마커 세트(13개 마커)의 기본 정보

본 연구팀에서 기 개발된 식미검정 마커 set는 13개 식미마커로 구성되어 있다(표 14). 이 마커들은 STS, SSR, Indel 마커로 PCR후 gel에 loading 하여 그 유전자형을 판독하고, 식미 회기식에 대입하여 식미 값을 구하도록 되어있다. 그러므로 이들 13개 마커를 다수의 집단에 적용할 때 많은 시간을 요하는 것이 사실이었다. 따라서 이 마커 세트를 좀 더 실용화하기 위해서는 high-throughput 검정이 가능한 방향으로의 개량이 요구되어 졌다. 이와 같은 이유로 식미 마커를 검정 시간도 단축하고 실험 방법도 간편한 HRM마커로 전환하기로 하였다.

	marker	Marker type	Primer sequence		검정방법
			forward(5'-3')	reverse(5'-3')	Gel
1	G4	STS	GAGACCGATATGCGATTC	GTGGTGTTTAGATCCAGAGAC TTA	2% agarose gel
2	M11		GTCCACTGTGACCACAACAT	GTCCACTGTGGGGATTGTTC	
3	E30		TACCTGGTTGATGTATACAGATCT GGTT	ATCCCTCGATCCCTCTAGCATT AT	
4	M2CG		ACAACGCCTCCGATGA	ACAACGCCTCCGACAACAAGAT	
5	P5		ACAACGGTCCGTCCTTGCTT	ACAACGGTCCAACAGATACTTT TGA	
6	J6		GTCGGAGTGGTCAGACCG	GTCGGAGTGGATGGAGTAGC	
7	WK9		CCCGCAGTTAGATGCACCATT	CCGCAGTTAGATCAAGTGGC	
8	A7		TGCCTCGCACCAGAAATAG	TGCCTCGCACCATGAG	
9	B1		GTTTCGCTCCTACAGTAATTAAGG G	GTTTCGCTCCCATGCAATCT	
10	S3c I	Indel	CCACTTCATGTCCTTGAAC	GCCATGACATTTGGACAT	3% agarose gel
11	GPA	SSR	AATACGCGGCCTTCTCCTAT	TTGATCCGAATGGGTCAAAT	
12	CBG	SSR	AGCTTCCCTAATGGCTTCGT	ATTTGCCAACTTTTGGATGG	
13	AMs	SSR	CTTCCAAGGACCCCATCCT	CCCAACATCTCCGTCAGAAT	
$Y(\text{식미값}) = 76.66 - 16.97(\text{G4}) - 1.94(\text{M11}) + 26.55(\text{E30}) - 2.40(\text{M2CG}) - 21.14(\text{GPA}) - 1.62(\text{S3cI}) + 19.01(\text{P5}) + 6.42(\text{B1}) + 13.45(\text{CBG}) + 3.87(\text{J6}) + 2.62(\text{WK9}) - 12.33(\text{A7}) - 8.72(\text{Ams})$					

표14. 본 연구실에서 개발된 식미 검정 마커 세트 및 식미 값을 구하는 회귀식(LESTARI P. *et al.* 2009)

(나) 검정법의 개량(HRM 마커로 전환)

① STS마커의 HRM 마커로의 전환

식미 마커 세트 중 9개의 STS 마커는 dominant 마커로서, gel에서 증폭된 DNA밴드 유무를 확인한다. 따라서 HRM을 수행했을 때에도 melting curve의 유무로 쉽게 유전자형을 판단할 수 있다. HRM 기기는 Idaho社의 LightScanner를 사용하였으며, LightScanner Software with Call-IT 2.0 으로 분석하였다. 그림 15에서 보는 것과 같이 STS dominant 마커인 P5 마커의 경우 gel 밴드가 있는 시료의 경우는 melting curve가 나타나고 밴드가 없는 시료의 경우는 curve가 없이 base line으로 나타난다. 이를 프로그램상에서 shifted melting curve로 변경·조절해 주면 아래 우측 그림과 같이 한 개의 melting type의 curve로 나타난다. 즉, 식미 마커 중 9개의 STS마커(dominant) 마커들이 이와 같이 melting curve의 유무로 쉽게 그 유전자형의 판독이 가능하므로 HRM마커로 전환하였다.

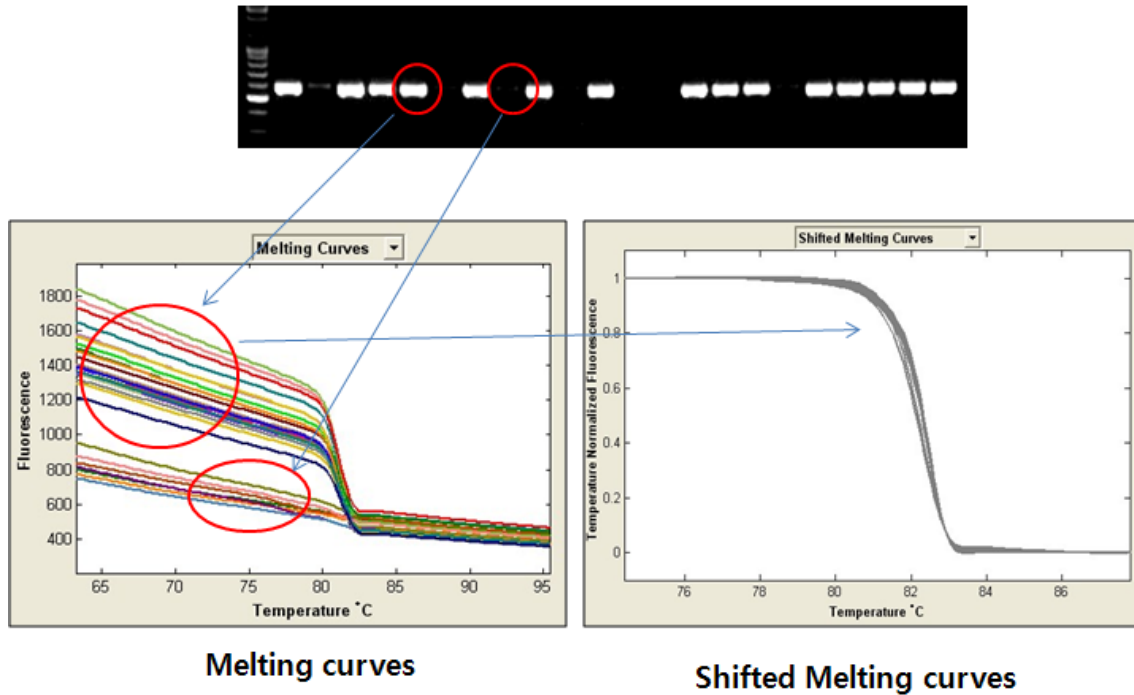


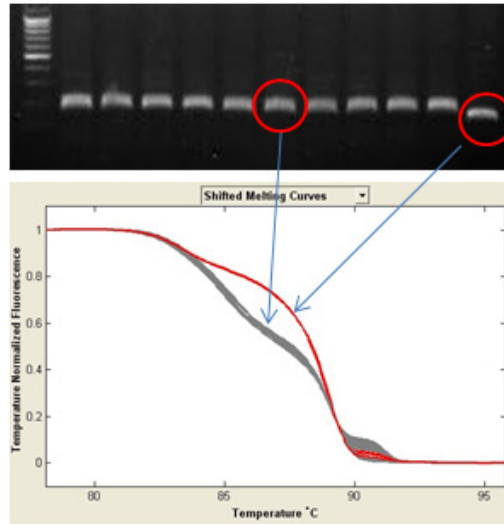
그림 15. 식미 P5 마커의 gel loading 결과와 HRM melting curve의 비교.

② SSR 마커의 HRM 마커로의 전환

: 식미 마커 세트 중 SSR마커인 GPA마커는 PCR후 증폭 밴드 크기 차이로 판독하는데, 그림16처럼 HRM 프로그램으로 shifted melting curve를 비교해 볼 때 curve 패턴의 차이로 쉽게 유전자형이 구분되며, 또한 프로그램을 통하여 많은 시료의 경우도 편리하게 grouping할 수 있다. 즉, HRM melting curve 패턴의 차이로 SSR마커를 HRM마커로 전환하였다.

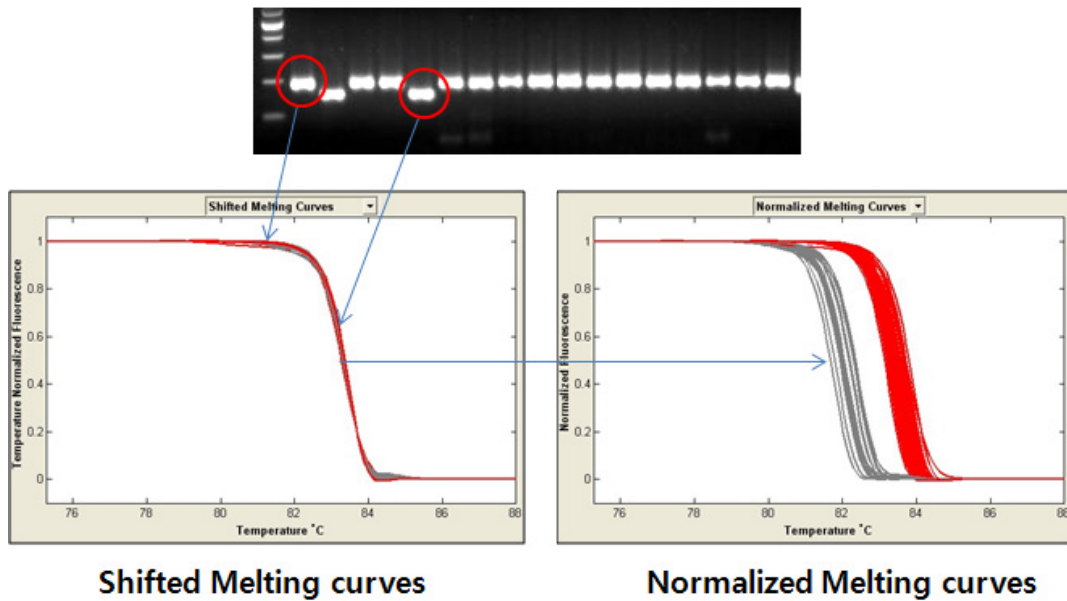
③ SSR 마커의 HRM 마커로의 전환 (CBG)

: 역시 SSR마커인 CBG마커도 PCR후 증폭 밴드 크기 차이로 판독하는데, 그림17의 좌측은 HRM 기기의 분석프로그램 중 scanning 모드의 shifted melting curve를 보여준다. 대부분 shifted melting curve의 차이에 의해 판독이 가능하나(위의 GPA와 같이), CBG는 그림과 같이 shifted melting curve가 일치 하므로 판독이 불가능하였다. 그러나 normalized melting curve mode로 melting curve를 추출하였을 때 우측과 같이 분리가 일어났고 이는 gel data와 일치 하였다. 즉, HRM 프로그램으로 melting curve를 추출하여 비교해 볼 때 normalized curve 패턴의 차이가 있었기 때문에 HRM마커로 전환하였다.



Shifted Melting curves

그림 16. 식미 GPA 마커의 gel loading 결과와 HRM melting curve의 비교.



Shifted Melting curves

Normalized Melting curves

그림 17. 식미 CBG 마커의 gel loading 결과와 HRM melting curve의 비교.

(다) 검정법의 검증 및 실용화

위와 같이 본 연구실에서 가지고 있는 품종 DNA를 이용하여, 13개 마커 중 12개의 마커를 HRM 마커로 전환하였다. 이렇게 전환된 HRM 마커들을 식미 마커 검정을 의뢰한 식미 육성 계통에 적용해 보았으며, 약 15,306점의 시료를 분석하여 식미값을 구하여 제공하였다.

마. 다수성 관련 *dep3* 유전자 지도 작성 및 분리

돌연변이 식미 계통을 탐색하던 중 이삭과 종실 모양이 변형되어 다수성이 기대되는 돌연변이체를 탐색하였다. 이 계통의 이삭은 직립이며, 이삭 당 종자수가 원품종보다 많고, 수량도 유의하게 증가하였다(그림 18). 곡립은 단원형으로 원품종보다 더 둥글어졌다. 향후 다양한 품질과 다수성을 위하여 이용성이 기대되는 돌연변이이다.

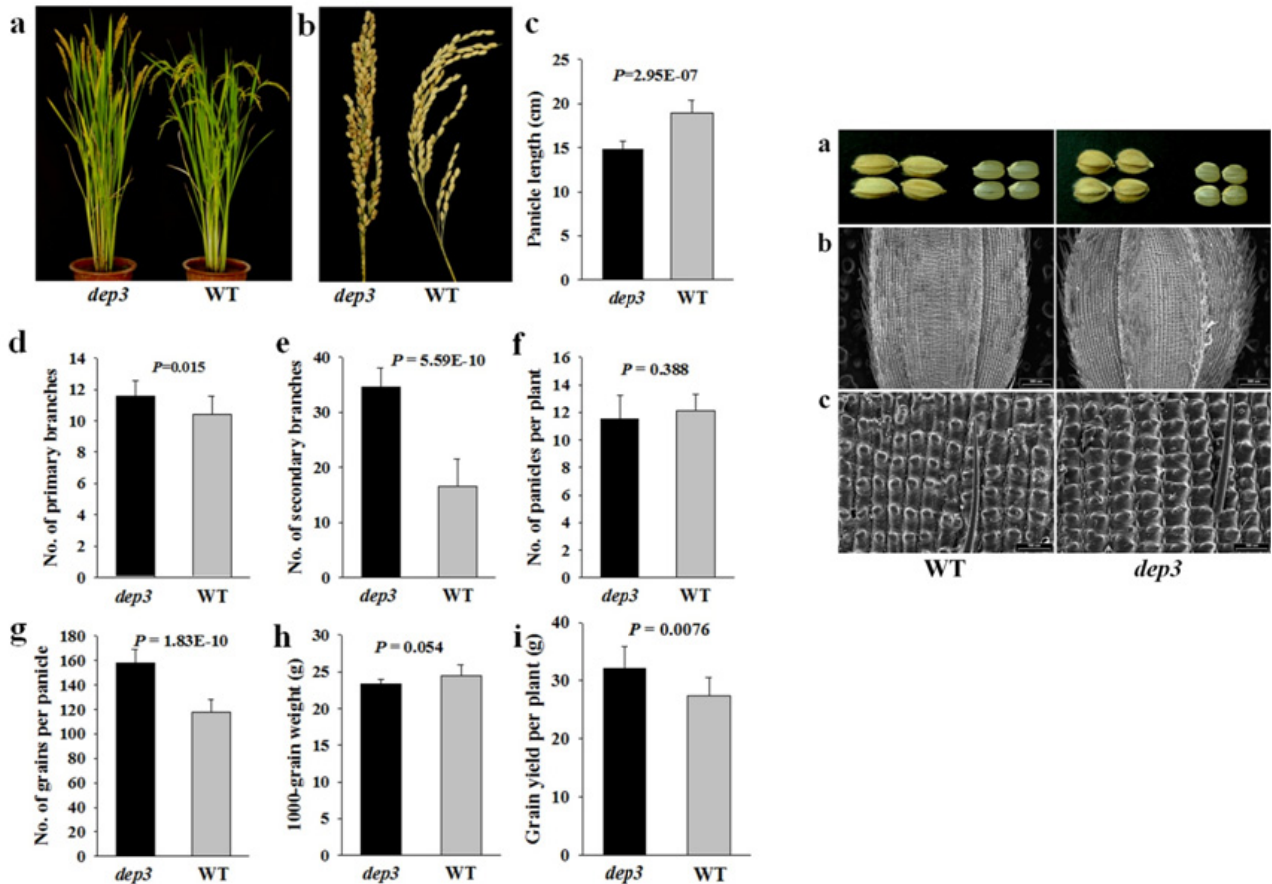


그림 18. 돌연변이 계통의 주요농업형질 및 종자 특성

M.23과 돌연변이 계통을 교배한 F2 세대에서 돌연변이 유전자에 대한 정밀유전자 지도를 작성하였다. 6번 염색체의 105cM 부근에 위치하고 있었는데, 73kb까지 좁힌 결과 *LOC_Os06g46550* 유전자의 3번째 exon을 포함하는 408bp의 deletion이 발생하여 유전자가 불활성화 됨을 밝혔다. 이 유전자는 a patatin-like phospholipase A2 (PLA2) superfamily domain-containing protein을 encoding하는 유전자이다. 이 유전자는 큰 직립이삭을 발현시키는 것으로서 세계 3번째로 동정되었으므로 *dep3*로 명명하여 논문으로 보고하였다.

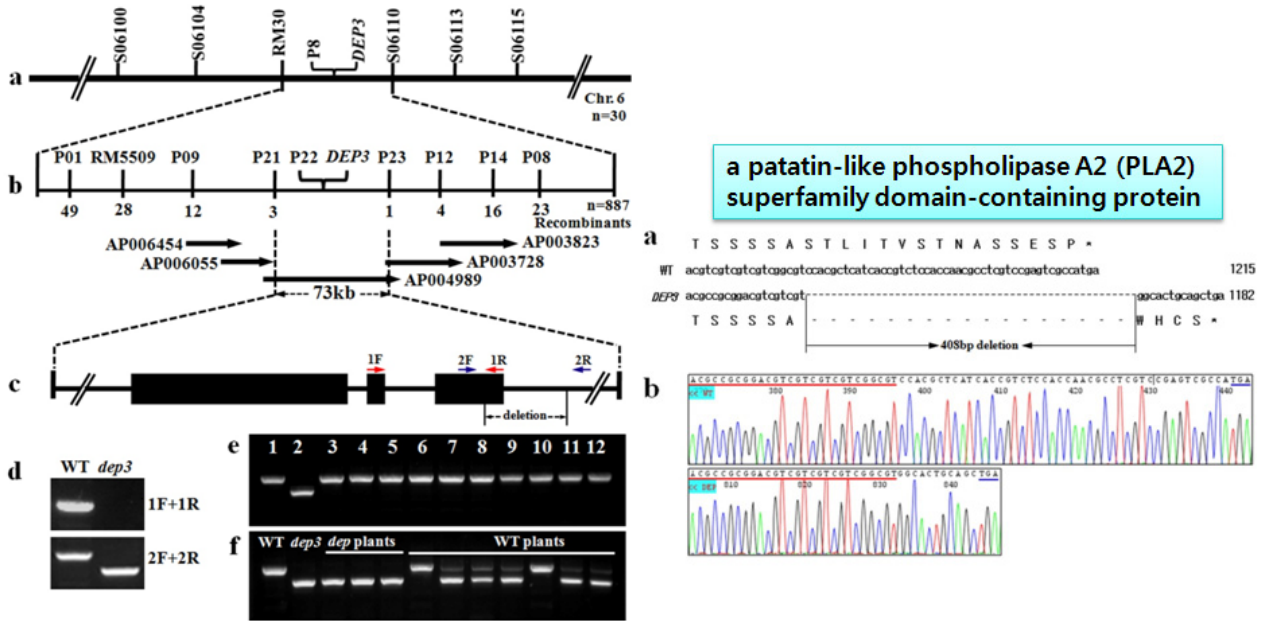


그림 19. 돌연변이 유전자 *dep3*의 정밀유전자지도 작성 및 후보유전자 동정

바. 벼 전분 생합성 관여 *RSUS3* 유전자의 변이 및 haplotype 다양성 연구

(1) 유전자원 내 *RSUS3* 유전자좌의 염기서열 변화 확인

Rice sucrose synthase 3 (*RSUS3*)는 종자 등숙에 중요한 역할을 하는 유전자로, 주로 벼의 유숙기에 많이 발현하여 전분 형성에 영향을 미친다 (Wang *et al.*, 1999). 본 연구에서는, 13개의 인디카 품종, 22개의 자포니카 품종, 8개의 야생벼 (*Oryza rufipogon*)를 포함한 총 43개 벼 품종에서 총 254개의 염기 변이를 밝혔다. 이 변이에는 promoter, exon, intron, 3', 5' downstream nontranscribed region (NTR)에 위치한 SNP와 indel이 포함되어 있다 (그림 20). 이 염기서열 변화를 바탕으로 nucleotide diversity, divergence estimates, neutrality tests를 수행한 결과, 표 15와 같은 결과를 얻었고, 이를 통해 이 유전자의 유전적 다양성을 분석할 수 있었다.

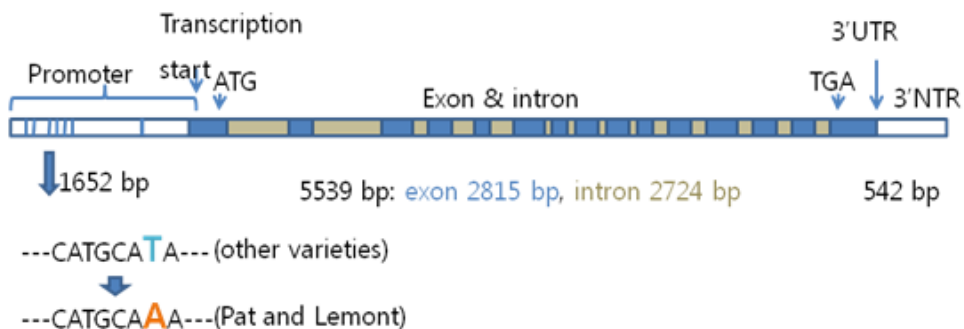


그림 20. 43개 벼 품종에서 증폭 및 염기서열 분석한 DNA 부분. *RSUS3* 유전자를 포함한 부분으로, 특히 promoter 지역의 품종간 변이를 볼 수 있음. UTR, untranslated region; NTR,

nontranscribed region; ATG, start codon; and TGA, stop codon.

표 15. *RSUS3* 유전자 각 부분에서의 염기서열 다양성 분석

Parameter	Promoter	Exon	Intron	3' downstream NTR	Promoter + transcript + downstream NTR	Entire length
S	14	13	22	8	35	57
π	0.269	0.292	0.336	0.204	0.263	0.291
k	0.514	0.613	0.762	0.277	0.406	0.481
D	0.514 ^{ns}	0.809 ^{ns}	1.501 ^{ns}	-0.326 ^{ns}	0.472 ^{ns}	0.923 ^{ns}
D^*	1.538*	1.508*	1.703**	1.308 ^{ns}	1.845**	1.959**
F^*	1.415 ^{ns}	1.507 ^{ns}	1.936**	0.926 ^{ns}	1.623 ^{ns}	1.894**

S , number of segregating sites; π , nucleotide diversity; k , average evolutionary divergence; D , Tajima's D test; D^* , Fu and Li's D^* ; and F^* , Fu and Li's F^* . ns, nonsignificant at 5%; * and **, significant at 5% and 1%, respectively.

(2) *RSUS3* 유전자좌의 염기서열 변이에 기초한 haplotype 다양성 분석

세 개의 지역 (5' NTR, transcript, 3' NTR)에서의 염기서열 변이에 기초하여 43개 품종을 11개의 haplotype으로 구분하였다 (그림 21). 이 haplotype 그룹간 진화적 거리를 계산한 결과는 표 16과 같다. 인디카, 자포니카, *O. rufipogon*의 벼 품종으로부터 구분한 *RSUS3* 유전자의 haplotype 다양성 분석은 본 연구에서 최초로 수행한 결과이며, 이는 추후 배유 전분 관련 우수 형질을 지닌 품종을 육종하고자 할 때 품종 선발을 위한 자료로 쓰일 수 있을 것이라 기대된다.

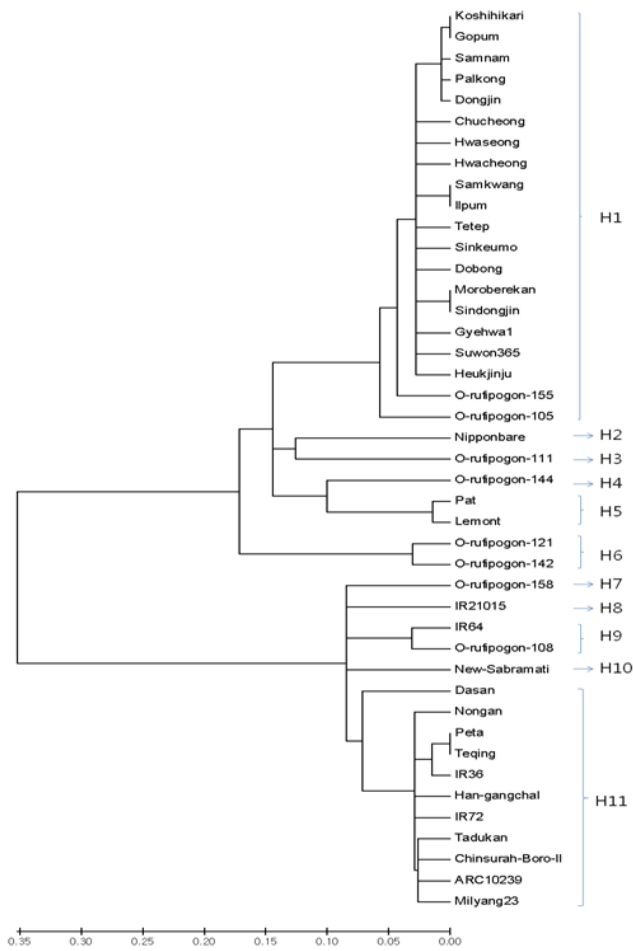


그림 21. *RSUS3*의 haplotype 관계를 나타내는 neighbor joining tree (H1~H11). 구분 기준은 *RSUS3*의 intron을 제외한 전체 DNA 지역의 염기서열 변이를 바탕으로 함.


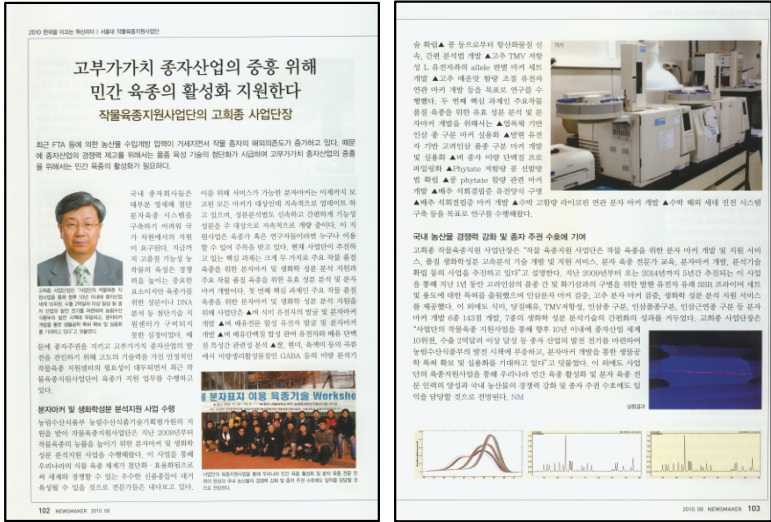
표 16. Haplotype 그룹간 진화적 거리의 평균 값.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
H1(20)	0.099										
H2(1)	0.227	—									
H3(1)	0.158	0.136	—								
H4(1)	0.153	0.202	0.095	—							
H5(2)	0.189	0.228	0.138	0.094	0.036						
H6(2)	0.340	0.387	0.358	0.303	0.395	0.018					
H7(1)	0.533	0.449	0.549	0.515	0.599	0.168	—				
H8(1)	0.607	0.409	0.571	0.537	0.621	0.187	0.134	—			
H9(2)	0.654	0.460	0.603	0.565	0.660	0.370	0.334	0.276	0.096		
H10(1)	0.931	1.166	0.937	0.890	1.020	0.395	0.439	0.344	0.342	—	
H11(11)	0.977	0.696	0.937	0.889	1.021	0.384	0.306	0.174	0.167	0.220	0.071

H, haplotype. Parenthesis indicates the number of varieties in each haplotype. Bold numbers indicate mean distances within the haplotype.

2. 분자마커 지원서비스

가. 작물육종지원 사업단 분자마커 지원 서비스 홍보

시 점	형 태	내 용
2009년 7월	설명회	국립종자원에서 개최. 참석자(육종회사 관계자 및 개인육종가 등 60여명)에게 사업단의 지원서비스 소개.
2009년 8월~	홈페이지	사업단 홈페이지 오픈 (http://pgbi.snu.ac.kr) 사업단 소개, 지원서비스 내용, 서비스 이용 절차 등 안내.
2010년 6월	신문광고	한국경제 신문 보도 자료 “혁신의 현장을 찾아서”- (포털사이트에도 동시 등록되어 사업단 관련기사 검색 가능). 
2010년 8월	잡지	잡지(NewsMaker) 보도 자료 「2010한국을 이끄는 혁신리더」 (포털사이트에도 동시 등록되어 사업단 관련기사 검색 가능). 

나. 분자마커 지원서비스 현황

작물	마커 종류	분석 수량(점)					마커별 합계
		1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도 (2012)	5차년도 (2013)	
벼	도열병		2,370				2,370
	품종 순도		500			597	1,097
	식미				8,064	7,242	15,306
인삼	품종구분	2,184					2,184
	품종 순도			1,690			1,690
수박	과육색구별		35				35
연도 별 합계		2,184	2,905	1,690	8,064	7,839	22,682

(* 7개 기관이 지원서비스 이용함.)

다. 분자마커 지원서비스 주요 기법

(1) High-throughput DNA 추출 및 다형성 판독:

96well collection tube 와 TissueLyser, 대용량 원심분리기를 사용하여 신속한 DNA추출이 가능토록 하였고, PCR후 gel loading 단계 없이 lightscanner를 사용하여 곧바로 시료의 다형성을 읽음으로 인해 DNA추출부터 유전자형 판독까지 다수의 시료를 빠르게 처리할 수 있음.



TissueLyser



대용량 원심분리기



Lightscanner

(2) 마커 set를 이용한 검정 방법 -식미마커 분석(13개 마커 set):

벼 식미에 관한 마커 검정은 본 연구실에서 기존에 개발한 자포니카 식미 마커 set(13개 마커를 검정하여 그 값을 회기식에 대입하여 식미값을 구하는 방식)를 사용하였다(표 17). 개발 당시에는 gel을 사용하였으나, 지원 서비스에는 13개 마커 중 대부분을 HRM을 이용하여 검정할 수 있도록 그 방법을 변경·개발하였고, 이를 통해 최종적으로 각 마커에 대한

유전자형 값을 구해 식미 회기식에 대입하여 계산한 뒤, excel 파일 결과를 의뢰자에게 제공하게 됨(그림 22).

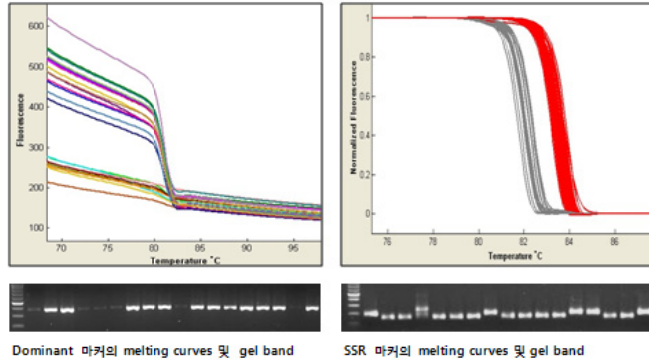
PCR primer	palatability by Toyo taste meter (P)			palatability by sensory test (ST)		
	parameter estimate	<i>t</i> value	<i>R</i> ²	parameter estimate	<i>t</i> value	<i>R</i> ²
G4	-16.97 ± 1.19	-14.22 **	0.087	-1.20 ± 0.06	-21.77 **	0.212
M11	-1.94 ± 0.60	-3.25 **	0.096	-0.14 ± 0.03	-5.03 **	0.010
E30	26.55 ± 0.83	32.12 **	0.104	0.86 ± 0.04	19.62 **	0.059
M2CG	-2.40 ± 0.56	-4.33 **	0.060	-0.38 ± 0.03	-15.21 **	0.041
GPA	-21.14 ± 1.11	-19.12 **	0.129	-0.82 ± 0.05	-17.28 **	0.021
S3cI	-1.62 ± 0.62	-2.60 *	0.017	-0.38 ± 0.03	-13.41 **	0.005
P5	19.01 ± 1.32	14.44 **	0.307	1.09 ± 0.04	26.81 **	0.288
B1	6.42 ± 0.77	8.30 **	0.047	0.41 ± 0.03	12.90 **	0.015
CBG	13.45 ± 1.11	12.12 **	0.087	0.68 ± 0.07	10.27 **	0.228
J6	3.87 ± 0.74	5.21 **	0.083			
WK9	2.62 ± 0.59	4.42 **	0.003			
A7	-12.33 ± 1.27	-9.72 **	0.031			
AMs	-8.72 ± 1.56	-5.58 **	0.021			
G81				0.27 ± 0.03	10.41 **	0.021
F6				0.32 ± 0.03	10.36 **	0.033
SSIIa				-0.27 ± 0.03	-8.06 **	0.001
G28				0.33 ± 0.04	8.81 **	0.005
AcPh				-0.48 ± 0.04	-11.44 **	0.060
intercept	76.66 ± 2.71	28.29 **		-0.54 ± 0.11	-4.74 **	
total			0.990			0.990
eq	$Y = 76.66 - 16.97(G4) - 1.94(M11) + 26.55(E30) - 2.40(M2CG) - 21.14(GPA) - 1.62(S3cI) + 19.01(P5) + 6.42(B1) + 13.45(CBG) + 3.87(J6) + 2.62(WK9) - 12.33(A7) - 8.72(Ams)$			$Y = -0.54 - 1.20(G4) - 0.14(M11) + 0.86(E30) - 0.38(M2CG) - 0.82(GPA) - 0.38(S3cI) + 1.09(P5) + 0.41(B1) + 0.68(CBG) + 0.27(G81) + 0.32(F6) - 0.27(SSIIa) + 0.33(G28) - 0.48(AcPh)$		

^a*** and *, significant at 1% and 5% level, respectively.

표17. 지원서비스에 사용된 13개 식미 마커 set 및 식미값(eq) 회기식 (LESTARI P. *et al.* 2009)

◆ 분석 방법: HRM을 통한 genotyping

LightScanner
(Idaho Technology, USA)



회기식의 값을 구하여 결과 제공

번호	교배번호	marker set												eq 값	
		G4	M11	E30	M2CG	P5	B1	J6	WK9	A7	GPA	S3c1	CBG		Ams
EQM 001		0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	96.64
EQM 002		0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	117.70
EQM 003	SR33245-1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	117.70
EQM 004	SR33245-2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	128.19
EQM 005	SR33245-3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	128.19
EQM 006	SR33245-4	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	96.64
EQM 007	SR33245-5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	121.57
EQM 008	SR33245-6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	121.57
EQM 009	SR33245-7	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	121.57
EQM 010	SR33245-8	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	119.32
EQM 011	SR33245-9	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	96.07
EQM 012	SR33245-10	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	96.07
EQM 013	SR33245-11	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	121.57
EQM 014	SR33245-12	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	121.57
EQM 015	SR33245-13	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	121.57
EQM 016	SR33245-14	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	98.69
EQM 017	SR33245-15	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	128.19
EQM 018	SR33245-16	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	121.57
EQM 019	SR33245-17	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	121.57
EQM 020	SR33245-18	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	96.64
EQM 021	SR33245-19	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	98.69

그림 22 . 식미마커 검정 방법. 주로 HRM을 사용하여 검정하여 식미 회기식에 대입하여 결과를 산출함.

라. 지원서비스 만족도 설문 조사 (2012년 3월)

- (1) 설문 조사 방식 : 지원서비스를 이용한 기관과 미이용 기관을 분류 하였고, 우편과 이메일을 통해 설문조사 실시(설문 문항은 별첨 6 참조)
- (2) 응답자 : 지원서비스 이용기관 22곳, 미이용 기관 6곳 응답
- (3) 응답 내용 요약 (지원서비스를 이용한 경우)

항 목	평균 점수 (만족: 5점)
1. 분석 기술 수준	4.8
2. 분석에 걸리는 시간	4.4
3. 분석료	3.4
4. 의사 소통	4.8
5. 품종 육성에 도움	4.6

응답내용	응답자(%)	분자마커 서비스	성분분석 서비스
분석료가 적절하고 이용할만하다		14 %	27 %
분석료가 적절하나 많은 시료를 의뢰하기엔 부담스럽다		82 %	73 %
분석료가 부적절하다		4 %	

적정 분석료	분자마커 서비스	성분분석 서비스
	2~3천원 (77 %)	5천원 이하 (32%) 5천~1만원 (41%) 2 ~ 3만원 (14%)

지원서비스를 이용한 경우, 분석 기술이나 분석 시간 등은 만족하나 분석료가 역시 부담된다는 의견이 다수였다. 의뢰자도 현실적으로 무료로 지원할 수 없는 것을 알고 있으나 많은 양을 분석하기에는 여전히 어렵다는 의견이었고 분석료 인하에 대한 요구가 많았다. 조금 더 저가의 서비스를 실시하면 훨씬 더 많이 이용할 의향이 있다는 것이었다.

(4) 지원서비스를 이용하지 않은 경우 응답

- 지원사업에 관한 인지도: 사업단의 지원서비스를 알고는 있음.
- 지원서비스에 대한 필요: 분자마커 및 성분분석 서비스를 모두 필요로 함.
- 이용하지 않은 이유
: 지원서비스에 대한 이해도 미흡, 사업단의 홍보 및 설명 부족, 자체분석가능, 불필요 등.
- 분석료에 대한 의견: 적절한 편이나 많은 시료를 의뢰하기에는 부담스러움.
- 적정 분석료
: 분자마커 - 약 3천원, 성분분석- 약 1만원
- 주요 대상 작물 및 원하는 서비스
: 가지과(고추, 토마토, 가지, 감자), 박과(수박, 참외, 오이, 멜론,호박), 근채류(무, 당근), 엽채류(배추, 양배추, 브로콜리, 상추, 시금치), 산형백합과(양파, 파), 식량작물(옥수수), 기타(참깨) → 거의 대부분의 작물
: 순도검정, 주요 기능성 성분(캡사이신, 라이코펜, 색소류, 비타민)

3. 분자표지 활용 워크숍: 식물분자표지이용 육종기술 워크숍 개최

- 가. 2009년부터 2014년 까지 총 5회(1회당 5일간의 교육)에 걸쳐 민간육종가를 대상으로 분자마커 이용 육종기술 이론 교육과 실험 실습을 실시하고 수료증을 수여함.
- 나. 교육 내용 : 식물 분자표지 이용 육종기술에 대한 강의와 실습
- 다. 교육의 특징 : 분자표지 이용에 관한 이론 강의와 직접 수행하는 실습 수업으로 교육생들의 이해도와 만족도를 높임. 소수의 교육생에 다수의 강사진으로 집중교육 형태로 진행. 교육 5일 동안 숙식을 모두 제공하여 원거리 교육생들도 참여할 수 있도록 도움을 줌.

표 18. 식물분자표지이용 육종기술 워크숍 (1~5회) 개요

	기 간	교 재 (자체 제작)	교육 장소	교육생 (명)	이론 강사(명)	실습 조교(명)
1회	2009.11.30.(월)- 12.4(금)	-식물분자표지이용 육종기술	서울 대학교	22	4	10
2회	2010.11.15.(월)- 11.19(금)	-식물분자표지이용 육종기술	서울 대학교	21	4	11
3회	2011.06.27.(월)- 07.01(금)	-유전체시대 채소육종전문가과정	서울 대학교	25	15	16

	기 간	교 재 (자체 제작)	교육 장소	교육생 (명)	이론 강사(명)	실습 조교(명)
4회	2012.06.25.(월)- 06.29(금)	-식물분자표지이용 육종기술, -식물분자표지이용 육종기술 실험실습 자료집	서울 대학교	20	7	9
5회	2013.06.24.(월).- 06.28(금)	-식물 내병성 육종기술, -식물 내병성 육종기술 실험실습 자료집	서울 대학교	17	15	13

라. 워크숍 이론 강의 및 실험 실습 프로그램

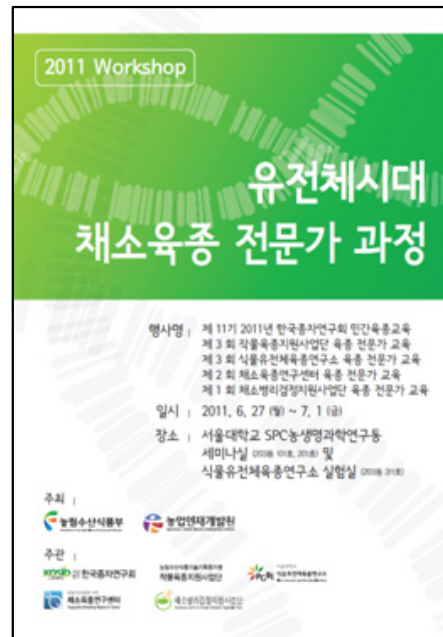
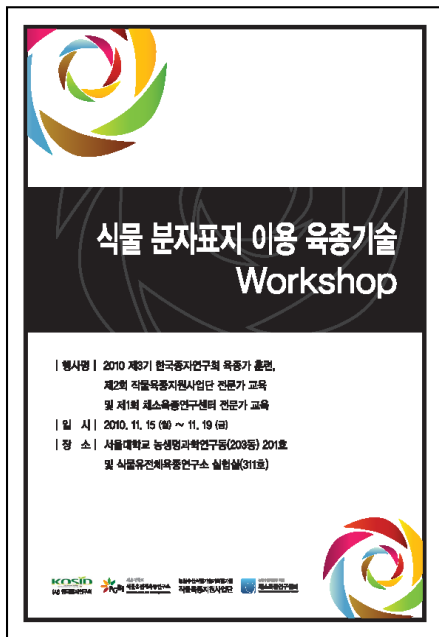
회차 (년도)	구분	강의(실습) 제목	강 사
1회 (2009)	이론 강의	1) 식물 육종의 방법 및 분자표지 이용 육종 소개	고희종 교수(서울대학교)
		2) 식물 분자표지의 종류 및 개발 방법	이석하 교수(서울대학교)
		3) 분자표지를 이용한 선발 육종의 실제	강병철 교수(서울대학교)
		4) 식물 유전체 연구와 유전체 기반 미래 육종기술	양태진 교수(서울대학교)
	실험 실습	1) 식물 DNA 추출	실습 조교(서울대학교)
		2) 식물 DNA 정량 및 분자표지 PCR	실습 조교(서울대학교)
		3) 식물 분자표지 PCR 확인 및 CAPS마커 검정을 위한 효소처리	실습 조교(서울대학교)
		4) CAPS마커 검정 결과 확인(표현형 비교)	실습 조교(서울대학교)
2회 (2010)	이론 강의	1) 식물 육종의 방법 및 분자표지 이용 육종 소개	고희종 교수(서울대학교)
		2) 식물 분자표지의 종류 및 개발 방법	허진희 교수(서울대학교)
		3) 분자표지를 이용한 선발 육종의 실제	강병철 교수(서울대학교)
		4) 식물 유전체 연구와 유전체 기반 미래 육종기술	박범석 박사(농촌진흥청)
	실험 실습	1) 식물 DNA 추출	실습 조교(서울대학교)
		2) 식물 DNA 정량 및 분자표지 PCR	실습 조교(서울대학교)
		3) 식물 분자표지 PCR 확인 및 CAPS마커 검정을 위한 효소처리	실습 조교(서울대학교)
		4) CAPS마커 검정 결과 확인(표현형 비교)	실습 조교(서울대학교)
3회 (2011)	이론 강의	1) 채소 균류병에 대한 저항성 검정 방법	최경자 박사(화학연구소)
		2) 채소 균류병에 대한 저항성 검정 방법	이선우 교수(동아대학교)
		3) 채소 바이러스병 저항성 검정 방법	김국형 교수(서울대학교)
		4) 채소 작물의 주요병에 대한 포장 검정법	김병섭 교수(강릉원주대)
		5) 유전체 시대의 채소육종	양태진 교수(서울대학교)
		6) 고추 품종 개발의 현황과 전망	안정환 대표(에코씨드)

		7) 고추 분자표지 개발의 현황과 전망	강병철 교수 (서울대학교)	
		8) 가지과 작물의 유전체 개발 현황 및 전망	최도일 교수 (서울대학교)	
		9) 분자표지 개발의 원리	박영훈 교수 (부산대학교)	
		10) 배추 품종 개발 현황 및 전망	변동해 대표 (배추와 육종)	
		11) 배추 유전체를 이용한 분자표지 개발	임용표 교수 (충남대학교)	
		12) 양과품종 개발 현황과 분자표지의 활용	김성길 교수 (전남대학교)	
		13) 박과작물 육종의 실제	김용재 박사 (파트너종묘)	
		14) 종자산업법의 이해	이승인 박사 (국립종자원)	
		15) 종자관리를 위한 분자표지의 활용 현황과 전망	권용삼 박사 (국립종자원)	
	실험 실습	1) 균류 병리 검정 실습	실습 조교(화학연구소)	
		2) 세균 병리 검정 실습	실습 조교(동아대학교)	
		3) 바이러스 병 검정 실습	실습 조교(서울대학교)	
		4) 전산 실습: 생물정보 DB 활용, 분자표지 개발 방법, 고추/배추/토마토 등 EST, SGN 활용 방법 소개	실습 조교(서울대학교)	
		5) PCR 실습, SNP 다형성검정(dCAPS, HRM)	실습 조교(서울대학교)	
		6) 분자표지 실제 적용(분리 집단 적용), Genetic mapping 실습	실습 조교(서울대학교)	
4회 (2012)	이론 강의	1) 식물 육종의 방법 및 분자표지 이용 육종 소개	고희종 교수 (서울대학교)	
		2) 식물 유전체 연구와 유전체 기반 미래 육종기술	양태진 교수 (서울대학교)	
		3) 식물 분자표지의 종류 및 개발 방법	이석하교수 (서울대학교)	
		4) 분자표지를 이용한 선발 육종의 실제 (내병성 육종, 품종감별 및 순도검정)	강병철교수 (서울대학교)	
		5) 유전체연구 역사와 육종적 응용, NICEM (서울대학교 농생명 과학공동기기원) 견학	최익영박사 (NICEM)	
		6) 종자관리를 위한 분자표지의 활용 현황과 전망	권용삼 박사 (국립종자원)	
		7) 종자산업법의 이해	이승인 박사 (국립종자원)	
	실험 실습	1) 전산 실습: 생물정보 DB 활용, 분자표지 개발 방법, 고추/배추/토마토 등 EST, SGN 활용 방법 소개	실습 조교(서울대학교)	
		2) 식물(고추 잎) DNA 추출 및 정량	실습 조교(서울대학교)	
		3) 내병성, 순도검정, 표현형 마커 검정용 시료 PCR 및 산물 확인(전기영동), 제한효소 처리	실습 조교(서울대학교)	
		4) SNP 다형성검정(HRM 분석)	실습 조교(서울대학교)	
		5) 분자표지 실제 적용(분리 집단 적용), Genetic mapping 실습	실습 조교(서울대학교)	
	5회 (2013)	이론 강의	1) 식물병리학개론	최경자 박사 (화학연구소)
			2) 균류병 저항성 검정 방법	최경자 박사 (화학연구소)
3) 세균병 저항성 검정 방법			이선우 교수 (동아대학교)	
4) 식물 육종의 방법 및 분자표지 이용 육종 소개			고희종 교수 (서울대학교)	
5) 유전체 연구 및 채소육종 현황			박민규 박사 (서울대학교)	
6) 채소 작물의 주요병에 대한 포장 검정법			김병섭 교수 (강릉원주대)	
7) 바이러스병 저항성 검정 방법			김국형 교수 (서울대학교)	
8) 식물내병성 육종 개론			강병철 교수 (서울대학교)	
9) 가지과 작물의 유전체 개발 현황 및 전망			최도일 교수 (서울대학교)	

		10) 유전체 정보를 이용한 분자표지 개발의 원리	양태진 교수 (서울대학교)
		11) 생물정보 DB활용 및 염기서열 분석방법 소개	박민규 박사 (서울대학교)
		12) 무 품종개발 현황 및 전망	박한용 교수 (세종대학교)
		13) 종자 관리를 위한 분자표지의 활용 현황과 전망	권용삼 박사 (국립종자원)
		14) 오이 육종의 현황 및 분자표지의 활용	송기환 박사 (동부한농)
		15) 수박 육종의 현황 및 분자표지의 활용	박영훈 교수 (부산대학교)
		16) 토마토 유전체를 이용한 분자표지 개발	심성철 교수 (세종대학교)
	17) 품종 보호 제도의 이해	이승인 박사 (국립종자원)	
	실험 실습	1) 균류 병리 검정 실습	최경자 박사 (화학연구소)
		2) 세균병 검정 실습	이선우 교수 (동아대학교)
		3) 바이러스병 병리검정 실습	실습 조교 (서울대학교)
		4) 전산실습: 생물정보 DB활용 및 염기서열 분석방법	실습 조교 (서울대학교)
		5) 분자표지 실제 활용(I) 내병성, 순도검정, 표현형 마커 검정용 시료 PCR 및 산물 확인(전기영동), 제한효소 처리	실습 조교 (서울대학교)
		6) 분자표지 실제 활용 (II): SNP 다형성검정(HRM)	실습 조교 (서울대학교)

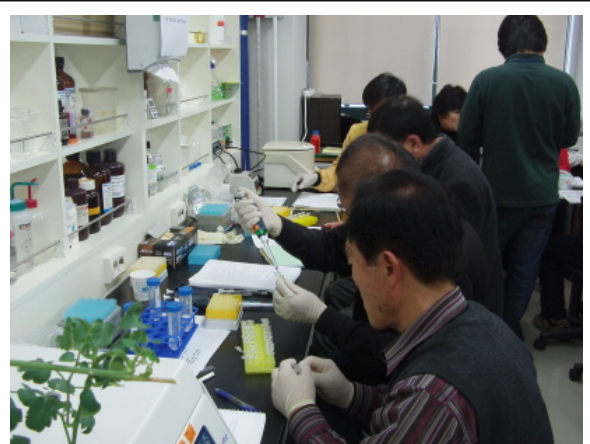
마. 워크숍 교재 자체 제작

식물분자표지이용 육종기술 및 실험 실습서 총 7권 제작





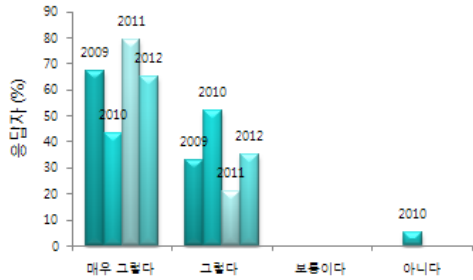
바. 워크숍 진행 사진



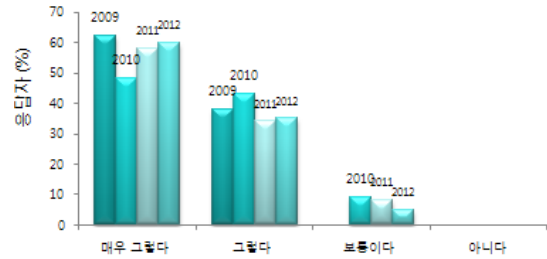


사. 워크숍 만족도

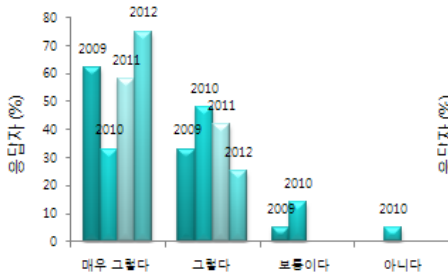
일주일간의 교육이 완료 되면, 워크숍에 관한 평가 설문(설문 문항은 별첨5 참조) 을 조사 하여 다음 교육에 반영하여 프로그램을 개선해 나갔다. 그 결과 교육 프로그램에 대하여 전반적으로 만족하고 도움이 되므로, 권유할 만한 프로그램이라고 응답하였다(그림 23).



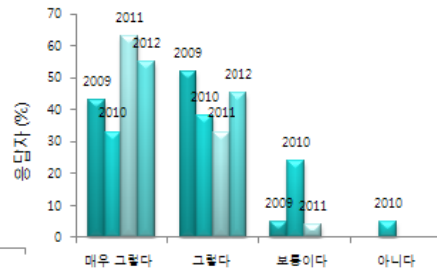
강의 만족도



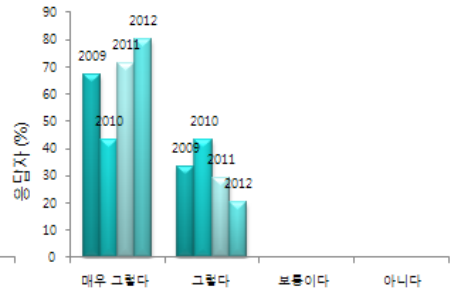
강의 유익도



실습 만족도



실습 유익도



동료에게 권유

그림 23 . 워크숍 진행 후 설문 조사 결과(2009~2012 제 1,2,3,4 회 결과)

2절 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발 및 지원 서비스 (제1-2 세부과제)

1. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 개발

가. 쌀, 현미, 유색미 등의 곡류에서 미량생리활성물질인 GABA 등의 미량분석기술 확립

(1) γ -Aminobutyric acid (GABA, C₄H₉NO₂)

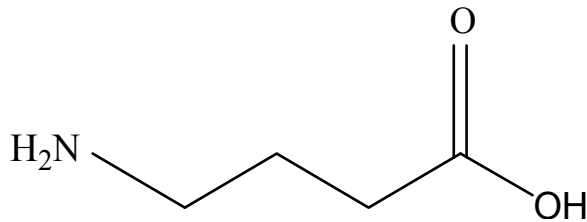


그림 1. GABA 구조

GABA는 1883년 처음으로 합성되고, 식물과 미생물 대사산물로만 알려졌었다. 그러나 1950년 미국의 생화학자인 Eugene Roberts에 의해 포유류의 뇌(중추신경계)에 존재하고 있는 것으로 알려졌다[그림 1].

비단백질 아미노산인 GABA는 주요 억제성 신경전달물질로서 다양한 질병의 치료에 중요한 역할을 한다. GABA는 혈압을 낮추고(stanton, 1963, Lacerda et al., 2003), 발작, 파킨슨병 및 정신분열증 등과 같은 정신질환과 관련되어있다(Bao et al., 1995). 또한 심혈관 질환 치료와 식이관리에 효과적이고(Hagiwara et al., 2004), 폐경기 여성의 불면증과 불안을 개선한다고 보고되었다(Okada et al., 2000).

식물에는 차, 미배아, 홍국, 뽕나무 잎에 GABA가 존재하는 것으로 나타난다.

식물체 내에서의 GABA는 식물세포의 활성화를 통한 성장과 자기보호기능에 중요한 역할을 한다. 또한 무산소증 같은 스트레스반응에 관여하고(Reggiani et al., 1995, Bouche et al., 2004), 세포내 pH를 감소시키며(Bown et al., 1997), 식물의 성장을 조절하는데 관여하는 것으로 나타났다(Rastogi et al., 1990, Galleschi et al., 1997). 그리고 병원성 방어 기작에 중요한 역할을 한다(Zimmerli et al., 2000).

(2) GABA 분석법 확립

쌀에 함유된 GABA 성분을 분석하기 위하여 E.H. Soufleros et al. (2003), P. Jannoey et al. (2010) 방법을 참고로 하였다. 각각 Ortho-phthalaldehyde (OPA)와 2-Hydroxynaphthaldehyde (HN) 유도체화 시약을 사용하여 분석 조건을 확립하였다.

(가) Ortho-phthalaldehyde (OPA) 유도체화를 통한 GABA의 분석법 확립

※ 다양한 유도체화 방법 중 ortho-phthalaldehyde (OPA)를 이용한 유도체화 방법을 사용하여 GABA 분석 조건을 확립하였다[그림 2].

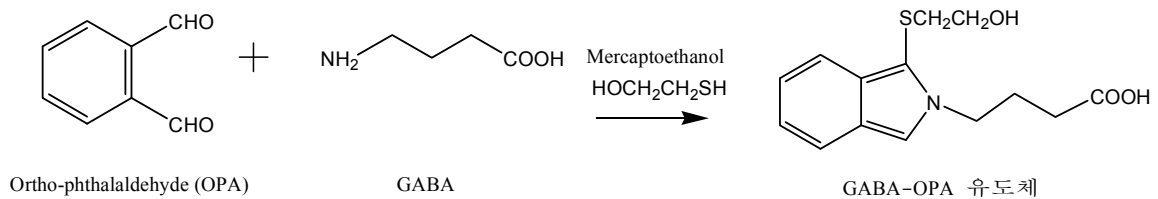


그림 2. GABA-OPA 유도체화 기작

① 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu HPLC
- Detector : Fluorescence detector (Ex. 350nm, Em. 450nm)
- Column : Shiseido UG120 (250 X 4.60mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Sodium acetate buffer with 5% tetrahydrofuran (THF), pH 5.7
 - Solvent B : Acetonitrile
- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

② 검량선 작성

GABA 표준품 10 mg을 DW 10 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 DW 10 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 10, 5, 2.5, 1, 0.5 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 400 μ l에 borate buffer (pH 10.4) 400 μ l와 Ortho-phthalaldehyde (OPA) 800 μ l를 넣고 5초 동안 혼합하였다. 2.5분 동안 상온에서 반응시킨 후 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 3, 4].

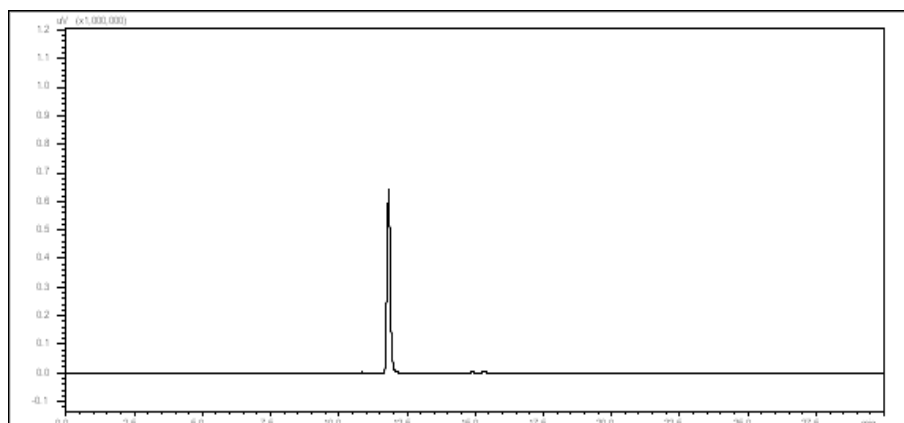


그림 3. GABA 표준용액(10ppm) 분석 결과 크로마토그램

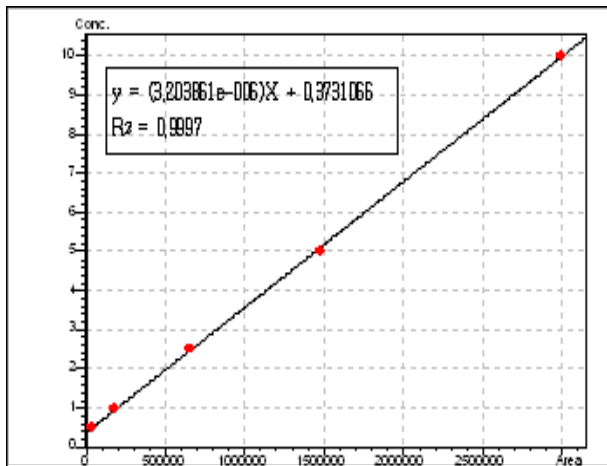


그림 4. GABA 표준용액 검량선

③ 시료의 추출 및 유도체화 반응

분쇄한 현미 0.25 g에 800 μ l 70% Ethanol를 가하고 TissueLyser II 에서 고속(10회/초)으로 3분간 혼합하였다. 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액은 새로운 tube에 옮기고, 잔류물은 다시 800 μ l 70% Ethanol를 넣어 혼합, 원심분리 하였다. 이 과정을 2회 반복 후 상등액만을 모아 0.2 μ m syringe filter에 여과하였다.

추출된 시료 400 μ l에 borate buffer (pH 10.4) 400 μ l와 Ortho-phthaldehyde (OPA) 800 μ l를 넣고 5초 동안 혼합하였다. 2.5분 동안 상온에서 반응시킨 후 HPLC로 분석하였다[그림 5].

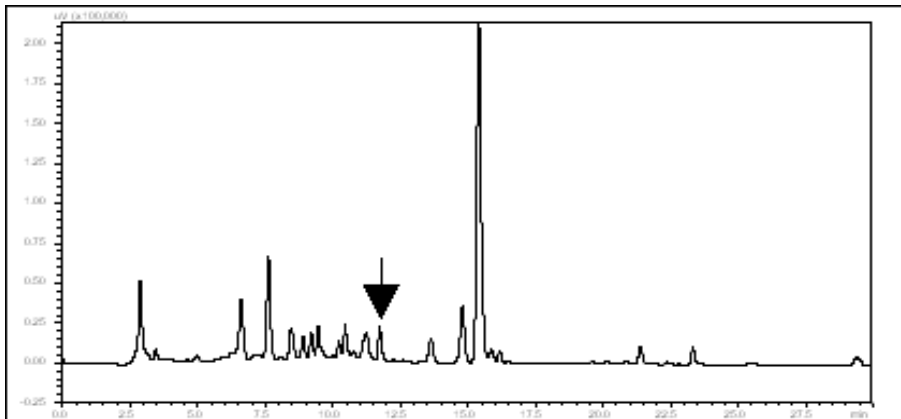


그림 5. 현미 시료 분석 결과 크로마토그램

(나) 2-Hydroxynaphthaldehyde (HN) 유도체화를 통한 GABA의 분석법 확립

※ GABA-OPA 유도체 이외에 GABA-HN 유도체화 방법도 많이 이용되고 있다[그림 6]. 본 연구에서는 GABA-HN 유도체화 방법을 이용한 분석 조건을 확립하고, GABA-OPA 유도체화 방법과 HN 유도체화 방법을 비교해보았다.

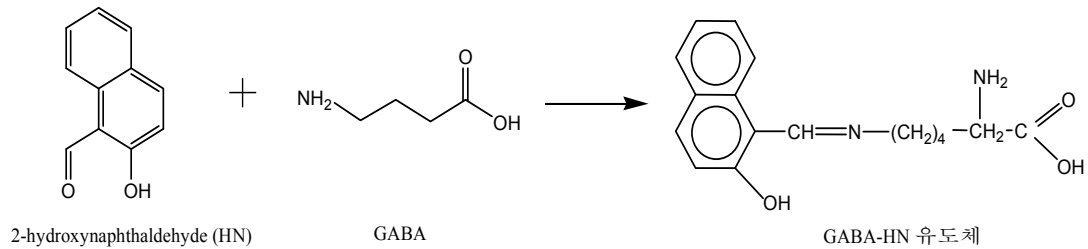


그림 6. GABA-HN 유도체화 기작

① 분석기기 및 분석조건

- Instrument : HP 1100 series HPLC (Hewlett Packard, USA)
- Detector : HP 1100 series Diode Array Detector (UV 330nm)
- Column : Shiseido UG120 (250 X 4.60mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile
 - Solvent B : DW (0.1% formic acid)
- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

② 검량선 작성

GABA 표준품 10 mg을 DW 10 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 DW 10 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 50, 25, 10, 5, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 500 μ l에 borate buffer (pH 8.0) 250 μ l와 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) 250 μ l를 넣고 80°C water bath에서 10분 동안 반응시켰다. 상온에서 식힌 후 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 7, 8].

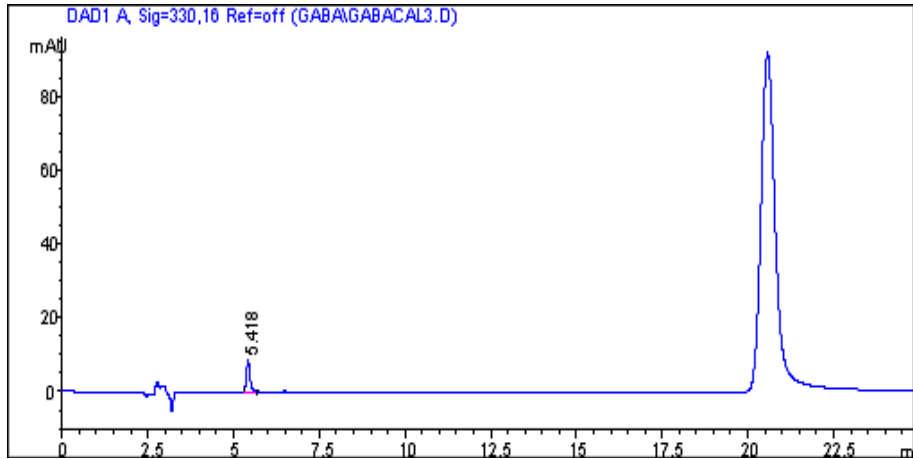


그림 7. GABA 표준용액(10ppm) 분석 결과 크로마토그램

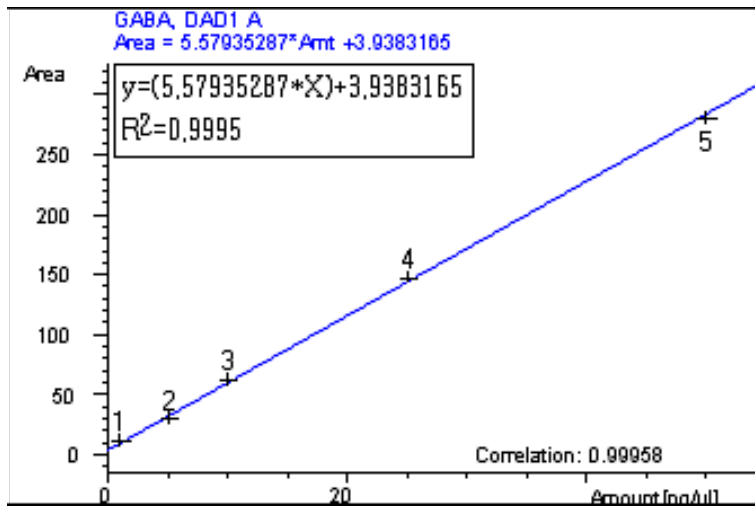


그림 8. GABA 표준용액 검량선

③ 시료의 추출 및 유도체화 반응

분쇄한 현미 0.25 g에 800 μ l 70% Ethanol를 가하고 TissueLyser II 에서 고속(10회/초)으로 3분간 혼합하였다. 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액은 새로운 tube 에 옮기고, 잔류물은 다시 800 μ l 70% Ethanol를 넣어 혼합, 원심분리 하였다. 이 과정을 2회 반복 후 상등액만을 모아 0.2 μ m syringe filter에 여과하였다[그림 9].

추출된 시료 500 μ l에 borate buffer (pH 8.0) 250 μ l와 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) 250 μ l를 넣고 80 $^{\circ}$ C water bath에서 10분 동안 반응시켰다. 상온에서 식힌 후 HPLC로 분석하였다.

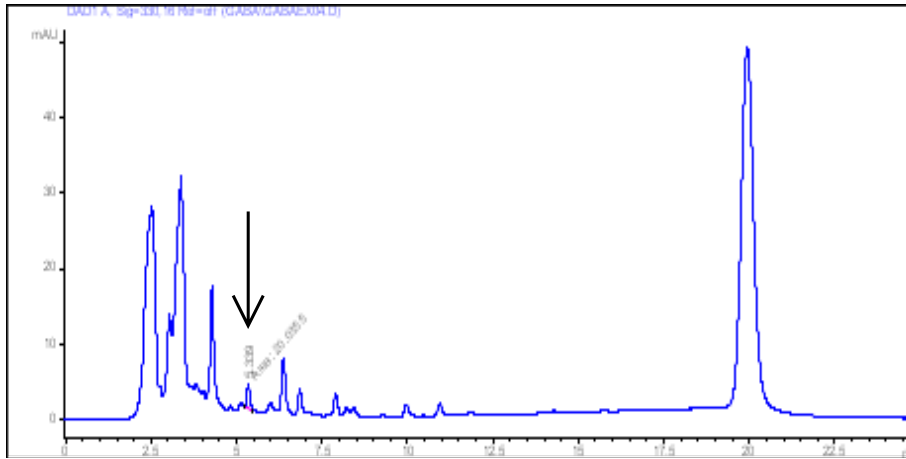


그림 9. 현미 시료 분석 결과 크로마토그램

(다) GABA의 OPA 유도체화 및 HN 유도체화 비교

: GABA-OPA 유도체화 및 GABA-HN 유도체화 결과를 비교 후 최종적으로 감도가 뛰어난 OPA 유도체화 방법(HPLC-형광검출기)을 GABA 분석법으로 확립하였다[그림 10, 11].

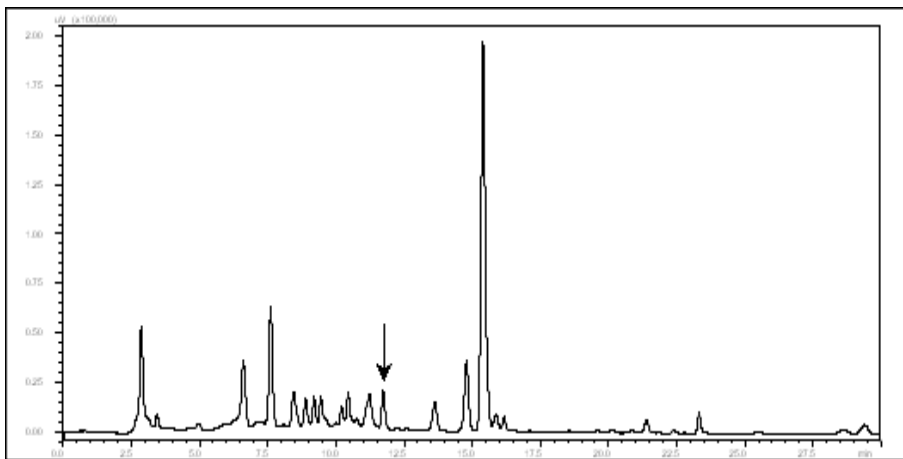


그림 10. GABA-OPA 유도체화 분석 결과 크로마토그램

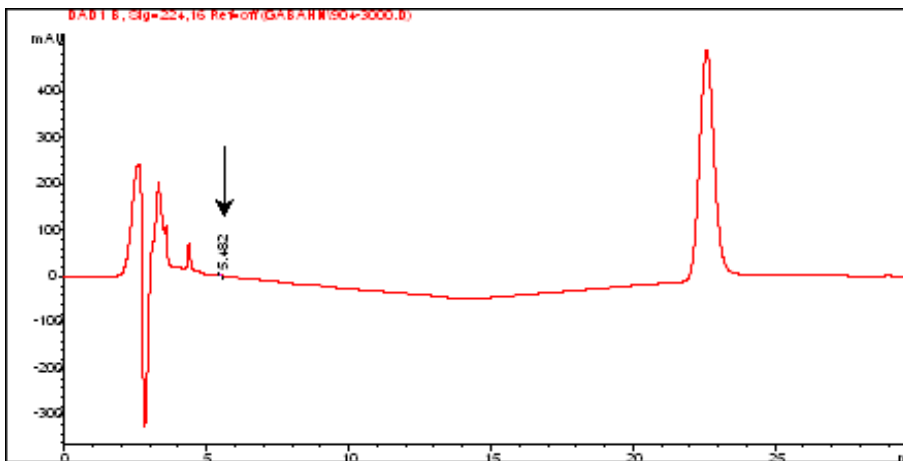


그림 11. GABA-HN 유도체화 분석 결과 크로마토그램

나. 콩 등으로부터 항산화물질 isoflavone, anthocyanin 신속, 간편 분석법 개발

(1) 콩 및 쌀에 함유된 항산화물질인 isoflavone의 동시 다분석 정밀 분석법 개발

(가) Isoflavone

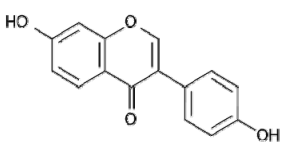
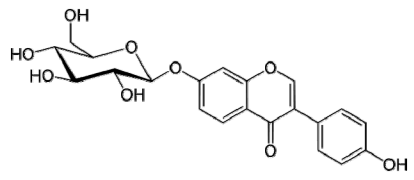
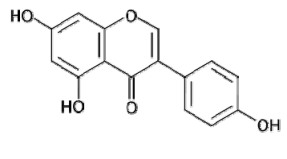
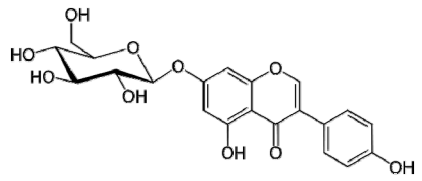
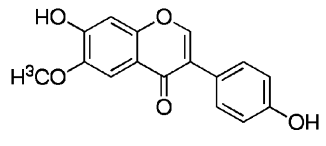
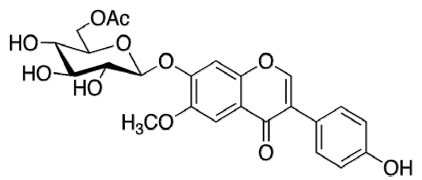
Isoflavone은 가장 널리 알려진 flavonoid로서 주로 콩류(legume)에 존재한다. Flavonoid 화합물의 기본적인 구조적 특징은 2개의 benzene ring이 hetero환상으로 연결되어 있는 구조인 flavonoid핵이 있는 형태이다.

Isoflavone류는 12개 정도가 알려져 있는데 주로 배당체의 형태로 존재한다. 그러나 체 내에서 흡수되어 생리적 유용성을 나타내기 위해서는 비배당체(aglycone) 형태로 되어야 한다. 배당체 형태의 isoflavone은 위산과 장내 미생물 효소인 β -glucosidase에 의해 유리상태의 genistein, daidzein 및 다른 대사산물 등으로 전환되어 장에서 흡수된다(RK Rishi, 2002).

콩의 isoflavone은 약 0.1~0.4%, 그중 genistein과 daidzein은 0.2~0.3%정도 함유되어 있으며 함량과 조성은 콩의 품종과 재배지역, 재배연도와 같은 재배환경에 따라 차이가 있다. 콩에서도 부위에 따라 함량 차이가 있는데 배아에 약 2%가 함유되어 있어 자엽에 비해 많다. 또한 콩과 콩잎에 함유된 isoflavone의 함량도 다르다.

거의 모든 콩가루와 농축물에는 isoflavone의 농도가 높은 반면(0.5~3.0 mg/g), 두부 등 콩 가공식품에는 이보다 적은 양이 함유된다(0.2~0.5 mg/g). 콩기름, 간장 같은 제품에는 아주 적은 양의 isoflavone이 함유되어 있다 (USDA database, 1999).

표 1. Isoflavone 구조 및 종류

비 배당체(Aglycone) 형태	배당체(Glycone) 형태
Daidzein 	Daidzin 
Genistein 	Genistin 
Glycitein 	Glycitin 

콩에 많이 함유된 isoflavone은 여성 호르몬인 estrogen과 구조적으로 유사한 특성을 가지고 있어 식물성 에스트로젠(Phytoestrogen)이라고 불린다. 주로 유방암, 전립선암 예방에 효과가 있으며, 각종 성인병 예방에 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 genistein은 estrogen receptor와 약하게 결합하여 estrogen 활성을 나타내어 유방암세포, 자궁경부암 세포 등 암세포 증식을 감소시키고 정상세포의 분열을 촉진한다. 또한, 혈중 dihydrotestosterone 농도를 낮추어 전립선암을 예방하기도 한다. 그 외에도 genistein은 활성산소를 제거하고, lipid peroxidation을 저해하며, superoxide anion 생성을 막는 역할을 한다. 동물실험을 통한 연구에서 glutathione peroxidase, catalase 등 항산화 효소의 활성을 증가시켜 암 예방에 기여한다. Daidzein, glycitein 역시 활성산소를 제거하는 효과를 갖는다.

알츠하이머질환의 경우 β -amyloid가 정상세포에 축적되는 특징을 갖는데 Lilian Valles 등은 estradiol과 genistein이 정상세포에서 β -amyloid 염증성 매개체 유발을 억제하는 것을 확인하였다. Yumiko Toyohira 등은 genistein이 noradrenalin과 같은 신경전달물질의 기능을 자극하여 noradrenalin 및 serotonin 흡수율을 상승시키고 결과적으로 뇌 기능에 도움을 준다고 보고하였다. 따라서 genistein의 섭취를 통해 신경전달물질의 부족에 따른 우울증 등의 부작용을 완화할 수 있다. 그러나 daidzein은 genistein과 달리 신경세포의 물질 전달에 거의 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다.

여성이 폐경기가 되면 estrogen의 농도가 약 30%까지 감소되어 각종 갱년기 증상이 나타나게 되는데, 폐경기 여성에게 isoflavone을 투여한 결과 안면홍조, 발한, 신경과민, 우울증, 수면장애, 다한증 등의 갱년기 증상이 개선되었으며, 에스트로겐의 부작용은 나타나지 않았다.

골다공증 예방과 관련된 연구들에서 isoflavone은 조골세포를 활성화시키고, 파골세포의 활성을 억제하며, 난소를 절제한 폐경기 이후 골다공증 모델 쥐에서 골 손실을 예방하였다. 난소를 절제한 성장기의 흰쥐에서도 genistein에 의해 골 질량의 손실을 억제할 수 있는 효과를 나타냈다. 대두식품을 많이 섭취한 여성의 경우 폐경기 이후에 골다공증 발병위험이 현저히 낮아졌다.

Isoflavone은 혈중 총 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤, 중성지방은 감소시켜주고, HDL 콜레스테롤은 증가시켜 심장병, 고혈압, 동맥경화 등의 심혈관계 질환을 예방한다. 그밖에도 인지기능 신체 구성의 변화(체지방량 감소 등)에 양성 효과를 나타낸다.

(나) Isoflavone 분석법 확립

※ 본 연구에서는 중요한 배당체 3종(Daidzin, genistin, glycitin) 및 해당 비배당체 3종(Daidzein, genistein, glycitein)의 동시분석법을 개발하였다.

※ 콩 및 쌀에 함유된 Isoflavone 성분을 분석하기 위하여 S.J. Lee et al(2010), R. Tsao et al(2010) 방법을 참고하였다.

① Isoflavone 표준품의 분석 조건 확립

㉞ 표준품 제조

Isoflavone 표준품 6종(Daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein) 각각 1 mg을 각각 dimethylsulfoxide(DMSO) 1 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution

을 조제하였다. 이 용액 100 μ l를 취하여 100% methanol 1 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 동량으로 혼합하여 mixture를 만들고 단계적으로 희석하여 10, 5, 2, 1, 0.2, 0.1 ppm 용액을 만들었다. 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

㉞ 표준품 UV spectra

광다이오드 검출기를 사용(파장범위; 200~600 nm)하여 isoflavone 6종의 최대 흡광 파장을 확인하였고 동시분석에 사용할 파장을 254 nm로 결정하였다[그림 12].

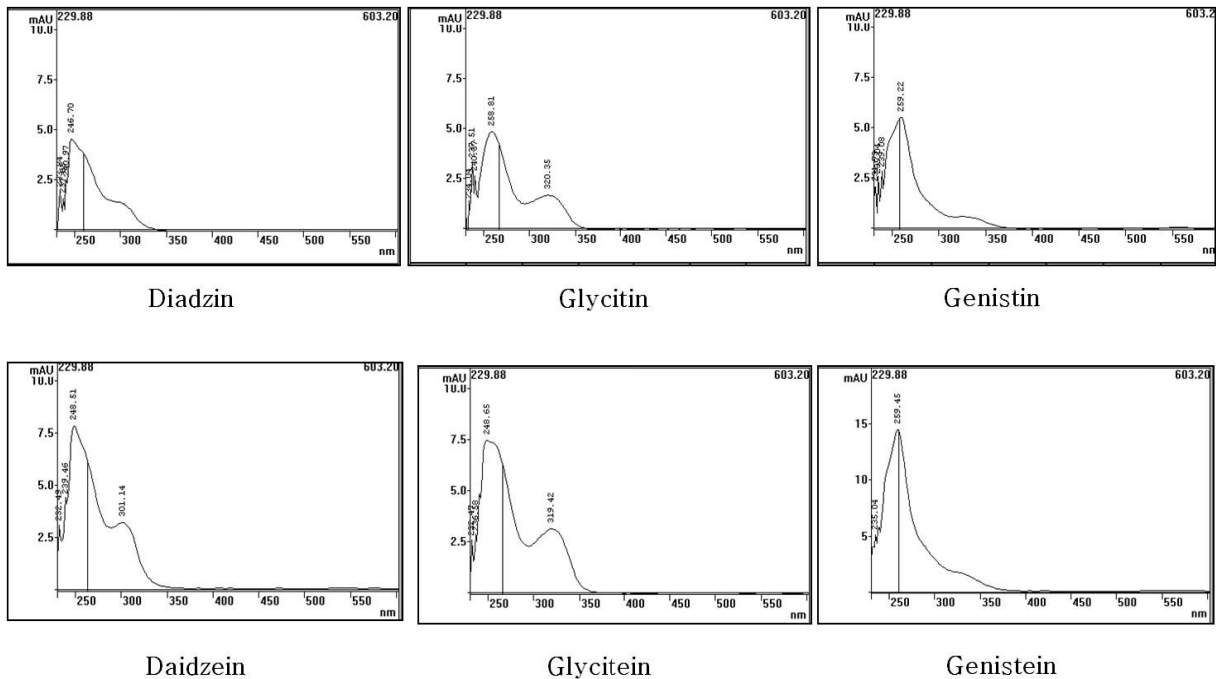


그림 12. Isoflavone 6종의 UV spectrum

㉞ Isoflavone 분석을 위한 이동상 조성 확립

※ 이동상에 각각 0.1% formic acid와 0.1% acetic acid를 넣고 isoflavone 표준용액을 분석 비교해본 결과 0.1% acetic acid를 첨가하였을 때 프론틱(fronting)이나 테일링(tailing) 현상이 줄어들고, peak 모양이 sharp 하게 나타남을 확인하였다[그림 13, 14]. 결과적으로 isoflavone 분석을 위한 이동상 조성은 acetonitrile과 water에 각각 0.1% acetic acid를 첨가하는 것이 가장 적합한 것을 확인하였다.

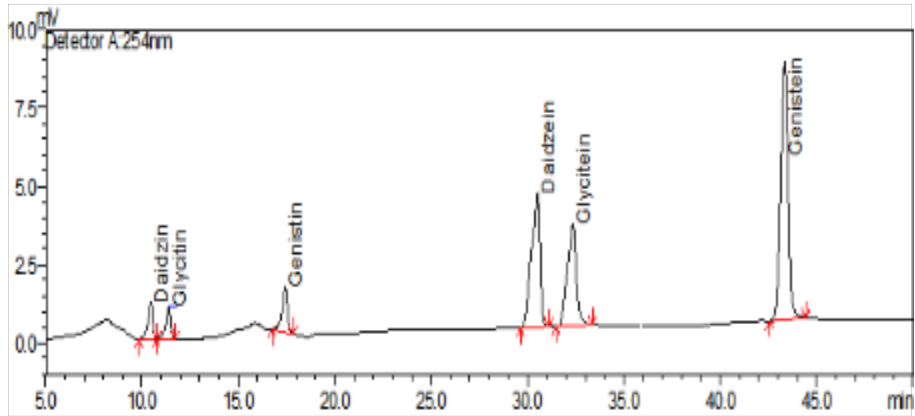


그림 13. 0.1% formic acid를 첨가한 이동상에서의 표준용액(1ppm) 분석 결과 크로마토그램

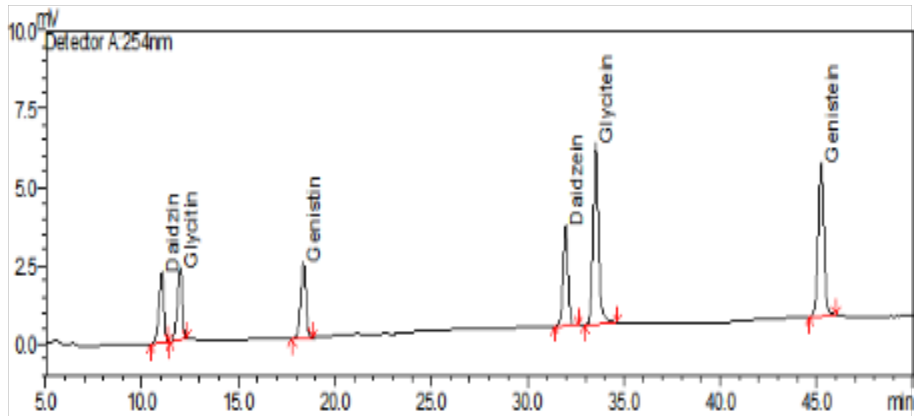


그림 14. 0.1% acetic acid를 첨가한 이동상에서의 표준용액(1ppm) 분석 결과 크로마토그램

㉔ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu HPLC
- Detector : Shimadzu UV detector (Wavelength; 254nm)
- Column : Shiseido C18 column (250 × 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% acetic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% acetic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	15	85
2	15	85
50	25	75
60	90	10
65	15	85
70	15	85

- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

② 추출 용매조성의 확립

㉠ 0.1% formic acid를 첨가한 70%, 100% methanol 용매 조성 분석

분쇄한 콩 0.1 g에 각각 0.1% formic acid를 함유하는 70%, 100% methanol 10 ml를 가하고 240 rpm에서 1시간 30분 동안 추출하였다. 추출물을 0.2 μ m nylon syringe filter에 여과 후 20 μ l씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

- Instrument : Agilent HP1100 series
- Detector : Diode array detector (Wavelength; 254nm)
- Column : Luna C18 column (250 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% formic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% formic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	15	85
2	15	85
50	25	75
60	90	10
65	15	85
70	15	85

- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

㉡ 80% methanol 및 1%HCL-20%methanol 용매 조성 분석

분쇄한 콩 0.1 g에 80% methanol, 1%HCL-20%methanol 30 ml를 가하고 250 rpm에서 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μ m PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 μ l씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

- Instrument : Shimadzu 10Avp HPLC
- Detector : Shimadzu UV detector (Wavelength; 254nm)
- Column : Shiseido C18 column (250 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% acetic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% acetic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	15	85
5	15	85
20	25	75
40	40	60
45	100	0
50	15	85
60	15	85

- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

㉔ 추출 용매 조성 확립 결과

※ 한국식품개발연구원에서는 콩에서 isoflavone 분석을 위한 추출용매로 0.1% acetic acid를 함유하는 70% methanol 용액을 사용하는데 본 연구실에서는 LC-MS 분석조건에도 활용하기 위하여 0.1% formic acid를 함유하는 70% methanol 용액으로 실험해보았다. 그 결과 methanol 비율에 따른 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 6가지 isoflavone (glucosides, aglycone)을 포함하여 다른 isoflavone 성분들 (malonyl-, acetyl-glucosides)은 검출되지 않았다[그림 15, 16]. 0.1% formic acid를 함유한 70%, 100% methanol 조건에서는 1시간30분으로 추출시간이 짧아 isoflavone 성분들이 충분히 추출되지 않은 것으로 추측된다. 이 결과와는 다르게 80% methanol 및 1%HCl-20%methanol 조건에서는 6가지 isoflavone 성분과 그 외의 다른 isoflavone 성분들이 나타나는 것을 확인하였다[그림 17-20]. R. Tsao et al.(2010)의 연구에서 추출방법의 차이에 따른 isoflavone 함량을 비교하였는데 강한 산성조건이나 4시간 이상 추출 할 경우 glucosides와 acetylglucosides로부터 생성된 genistein이 불안정한 것을 확인하였다. 또한 direct injection과 3가지 hydrolysis 방법(산, 알카리, 효소) 사이에 총 isoflavone 함량은 차이가 없었다. 추출방법의 용이함과 간편함을 위해 80% methanol 및 1%HCl-20%methanol로 12시간 이상 추출하여 분석해보았고, 그 결과 두 가지 추출용매에서 모두 6가지 isoflavone 성분이 모두 분리되는 것을 확인하였다. Malonyl-, acetyl-glucosides와 같은 다른 isoflavone 성분들도 검출된 것을 확인하였다 [그림 7-10]. 80% methanol로 추출했을 때 daidzin을 포함한 배당체 3종 함량이 높게 나타났고, 반대로 비배당체 함량은 1%HCl-20%methanol로 추출하였을 때 더 높게 나타났다. 총 isoflavone 함량은 80% methanol에서 약 1.2배 이상 높은 것을 확인하였다 [표 2, 3]. 본 연구에서는 총 isoflavone 함량이 높은 80% methanol을 사용하기로 하였다.

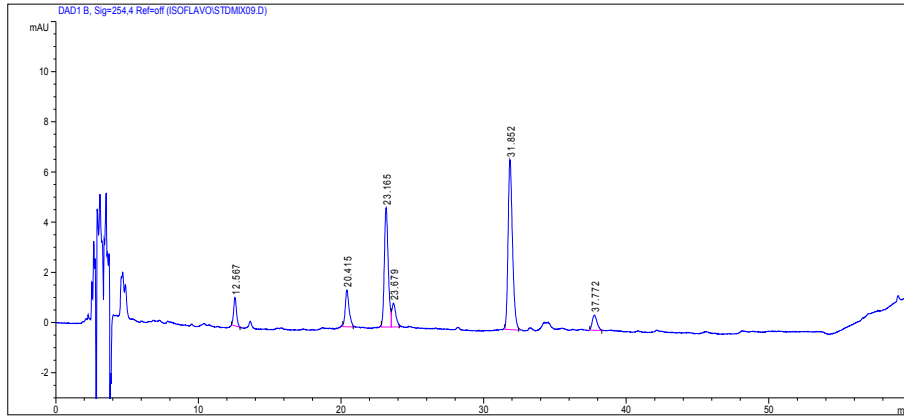


그림 15. 0.1% formic acid를 첨가한 70% methanol로 추출한 백태 시료 분석 크로마토그램

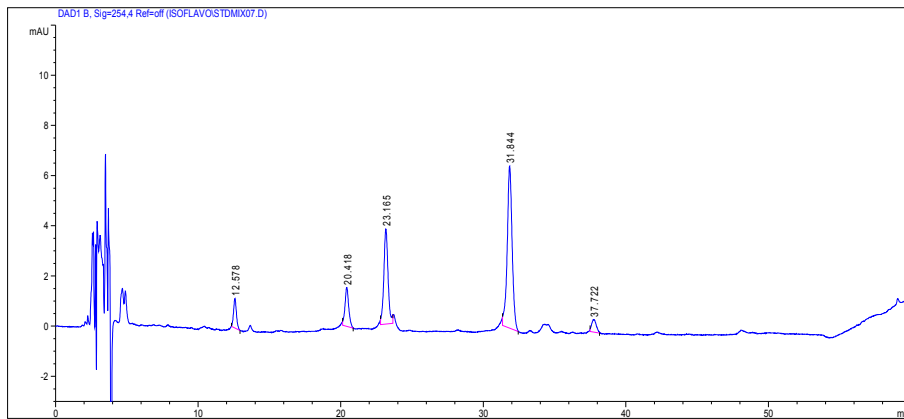


그림 16. 0.1% formic acid를 첨가한 100% methanol로 추출한 백태 시료 분석 크로마토그램

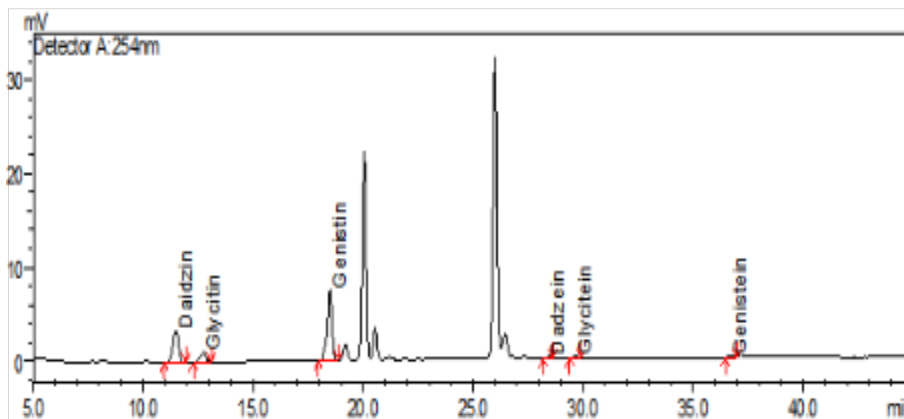


그림 17. 80% methanol로 추출한 백태 시료 분석 크로마토그램

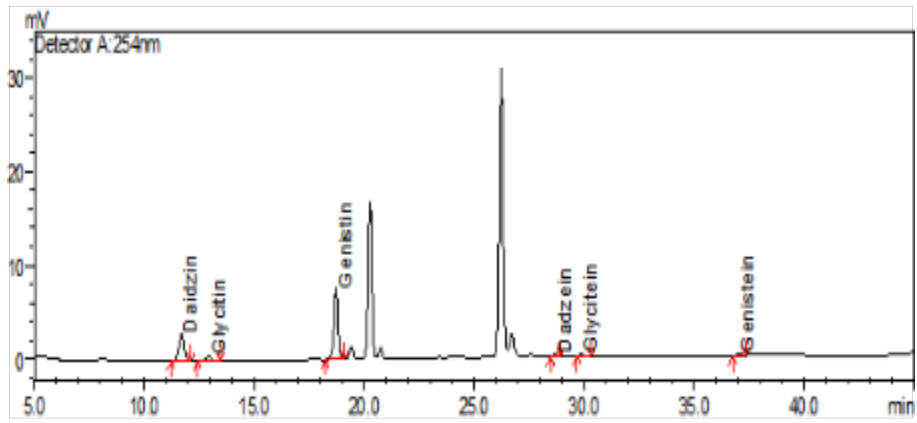


그림 18. 80% methanol로 추출한 서리태 시료 분석 크로마토그램

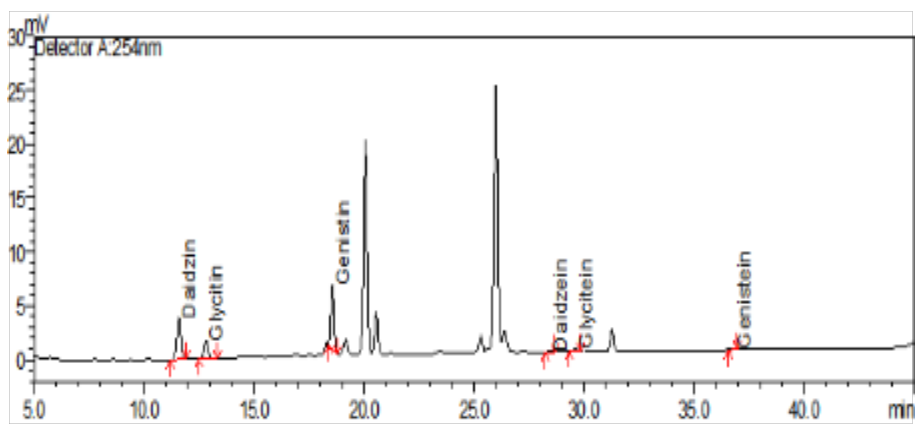


그림 19. 1% HCl-20% methanol로 추출한 백태 시료 분석 크로마토그램

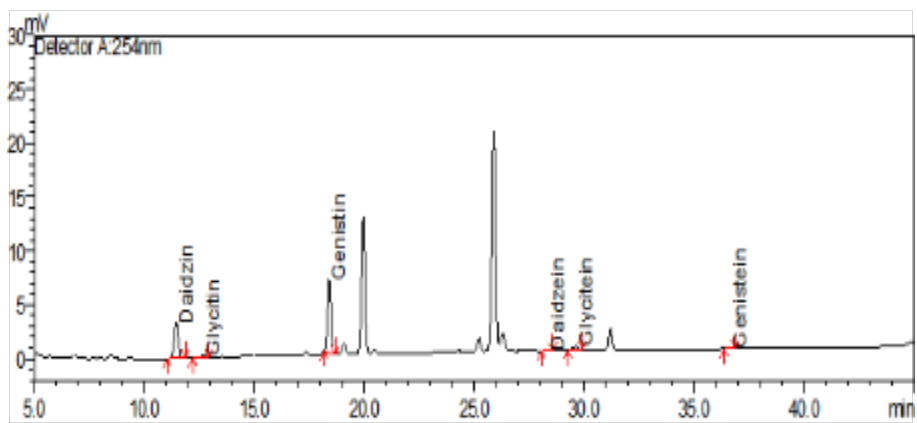


그림 20. 1% HCl-20% methanol로 추출한 서리태 시료 분석 크로마토그램

표 2. 80% methanol로 추출한 콩 시료 함량 결과 ($\mu\text{g/g}$)

80% methanol							
	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total isoflavone
백태	448.5	168.3	655.2	9.3	52.2	39.9	1373.4
서리태	366.6	116.4	564.6	12.0	55.2	42.6	1157.4

표 3. 1%HCl-20%methanol로 추출한 콩 시료 함량 결과 ($\mu\text{g/g}$)

1%HCl-20%methanol							
	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total isoflavone
백태	237.0	135.9	270.0	54.9	199.2	52.8	949.8
서리태	210.0	63.3	315.0	54.6	204.0	53.4	900.3

③ 최적 추출시간 확립

※ 대부분의 연구에서는 추출시간이 4시간에서 12시간으로 오래 걸리는 편이다. 또한 일부 isoflavone의 경우 추출시간이 길어질수록 불안정하여 추출효율이 떨어질 수 있다 (R. Tsao et al., 2010). 작업의 편리성과 추출시간의 단축을 위해 1시간과 12시간 추출 과정을 통하여 그 차이를 비교해보았다.

㉠ 시료의 추출

분쇄한 콩 0.1 g에 80% methanol 30 ml를 가하고 250 rpm에서 각각 1시간, 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μm PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 μl 씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

㉡ 추출 시간의 확립

※ 80% methanol을 추출용매로 하여 각각 1시간, 12시간 동안 추출하였을 때 총 isoflavone 함량이 백태 1시간 추출물에서는 1079.1 $\mu\text{g/g}$, 12시간 추출물에서는 1373.4 $\mu\text{g/g}$ 이었고, 서리태 1시간 추출물에서는 899.1 $\mu\text{g/g}$, 12시간 추출물에서는 1157.4 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다[그림 21-24, 표 4, 5]. 총 isoflavone 함량은 12시간 추출이 1시간 추출에 비해 약 1.3배 더 높은 것을 확인하였다. 최적 추출시간은 총 isoflavone 함량이 높게 나타난 12시간으로 결정하였다.

■ 1시간 추출 결과 시료 분석 크로마토그램

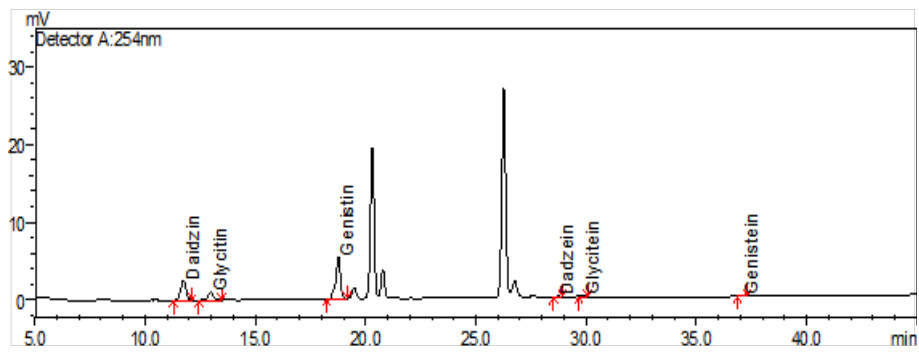


그림 21. 백태의 1시간 추출 시료 분석 크로마토그램

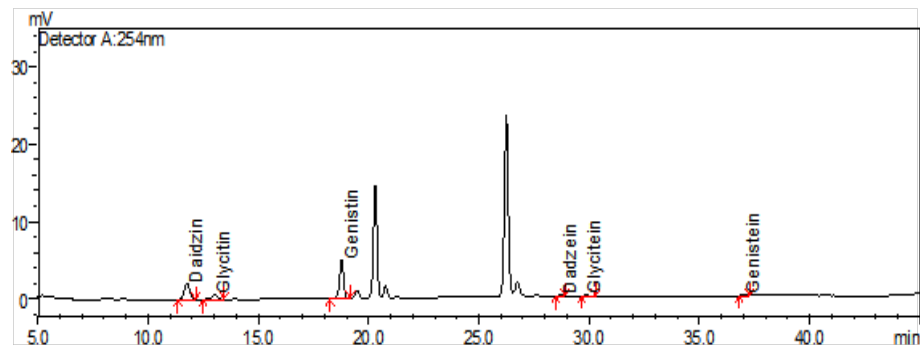


그림 22. 서리태의 1시간 추출 시료 분석 크로마토그램

■ 12시간 추출 결과 시료 분석 크로마토그램

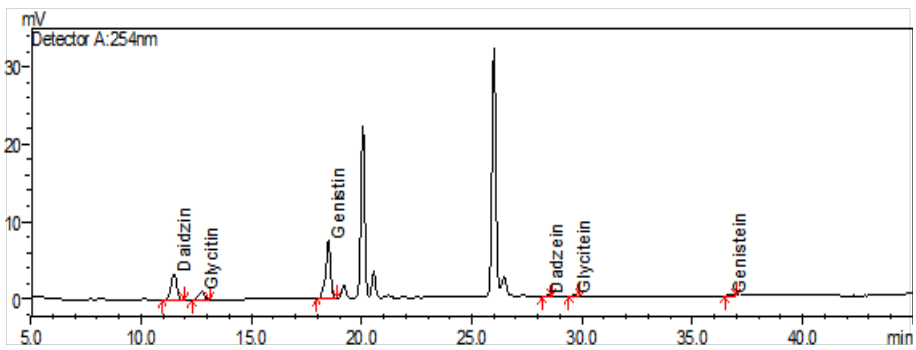


그림 23. 백태의 12시간 추출 시료 분석 크로마토그램

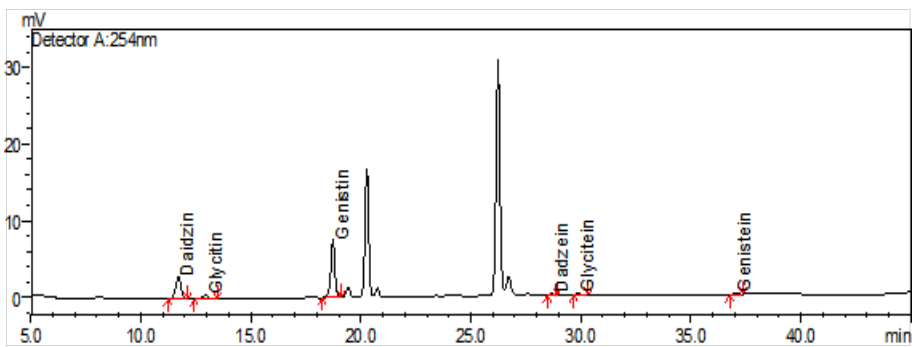


그림 24. 서리태의 12시간 추출 시료 분석 크로마토그램

■ 추출시간에 따른 isoflavone 함량 결과

표 5. 1시간 추출물의 isoflavone 함량 결과

Isoflavone 함량 (µg/g)							
	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total isoflavone
백태	345.9	168.0	473.1	6.6	47.1	38.4	1079.1
서리태	286.2	132.0	381.9	8.7	51.3	39	899.1

표 6. 12시간 추출물의 isoflavone 함량 결과

Isoflavone 함량 (µg/g)							
	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total isoflavone
백태	448.5	168.3	655.2	9.3	52.2	39.9	1373.4
서리태	366.6	116.4	564.6	12.0	55.2	42.6	1157.4

㉔ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu HPLC
- Detector : Shimadzu UV detector (Wavelength; 254nm)
- Column : Shiseido C18 column (250 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% acetic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% acetic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	15	85
5	15	85
20	25	75
40	40	60
45	100	0
50	15	85
60	15	85

- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 µl

(다) Isoflavone 분석법 검증

※ 이상의 실험으로 이동상 조성은 0.1% acetic acid를 첨가한 acetonitrile과 water이고, 추출용매는 80% methanol, 추출시간은 12시간으로 정하고 이 방법의 유효성을 확인하기 위해 검출한계와 정량한계, 재현성, 직선성, 회수율을 진행하였다.

① 검출한계, 정량한계

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 분석기기의 감도를 검증할 수 있는데, 다양한 농도의 표준용액을 분석하여 S/N(signal과 noise 비율)을 구한결과는 다음과 같다[표 6]. 검출한계는 S/N>3~5배, 정량한계는 S/N>10배(LOD의 3~5배 이상)로 하였다.

표 6. Isoflavone 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

Isoflavones	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein
LOD(ng)	1	0.4	1	1	0.4	0.4
LOQ(ng)	4	2	2	4	2	2

② 재현성

분석의 재현성 시험은 일정한 양의 표준품을 7번 이상 반복 주입 분석하여 머무름 시간(t_R), peak의 면적(Area)의 오차를 조사하는데, 전체적으로 분석기기의 안정성을 알아보기 위해 수행한다. 본 연구에서 설정한 정량한계의 양(LOQ, 10LOQ 수준으로 진행)을 연속으로 7번 분석한 결과, t_R , area의 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다[표 7].

표 7. Isoflavone의 재현성 실험 결과

Isoflavones		Daidzin	Glycitin	Genistin	Diadzein	Glycitein	Genistein	
LOQ N=7	t_R	Average	11.7	13.8	18.6	28.5	30.5	37.9
		C.V	0.7	0.8	0.5	0.4	0.2	0.4
	Area	Average	8780.3	5015.3	10943.3	13573.7	6368.3	10716.1
		C.V	3.0	3.1	5.3	0.5	2.8	1.7
10LOQ N=7	t_R	Average	14.2	13.8	19.4	30.8	30.5	37.9
		C.V	7.3	1.3	5.2	2.8	0.4	0.4
	Area	Average	94763.1	51437.3	103450.1	140546.6	67825.1	116379.4
		C.V	2.9	0.8	1.7	1.1	2.7	1.0

③ 직선성

㉠ 표준용액 조제

Isoflavone 표준품 6종(Daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein) 각 1 mg을 각각 dimethylsulfoxide(DMSO) 1 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 100 μ l를 취하여 100% methanol 1 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 동량으로 혼합하여 mixture를 만들고 단계적으로 희석하여 10, 5, 2, 1, 0.2, 0.1 ppm 용액을 만들었다. 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 25].

㉡ Isoflavone 표준용액(0.1~10ppm) 검량선의 직선성 시험

Isoflavone 표준용액(0.1~10ppm)을 분석하여 얻은 검량선은 $R^2=0.999$ 이상으로서 직선성이 우수함을 확인하였다[그림 26-31].

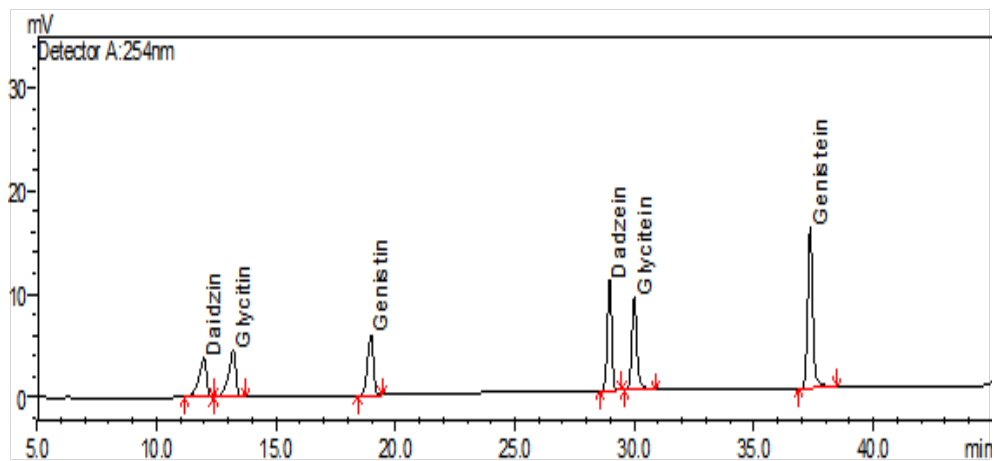


그림 25. Isoflavone 표준용액(1ppm) 분석 크로마토그램

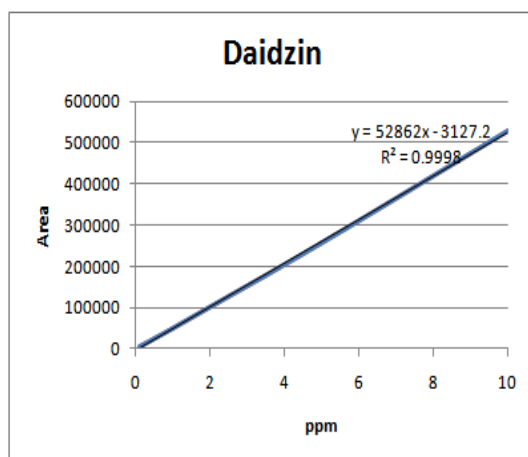


그림 26. Daidzin의 검량선

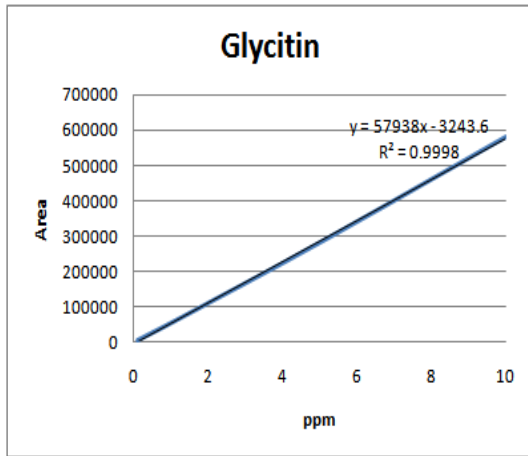


그림 27. Glycitin의 검량선

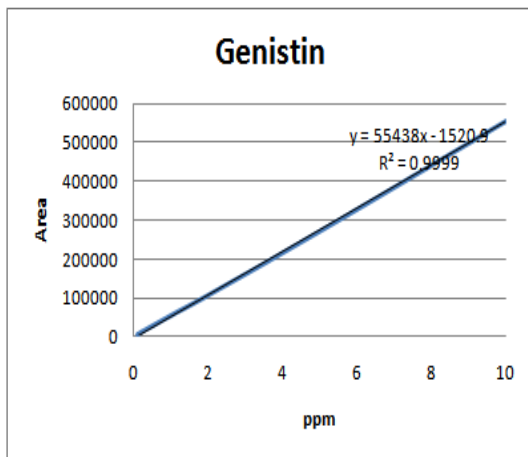


그림 28. Genistin의 검량선

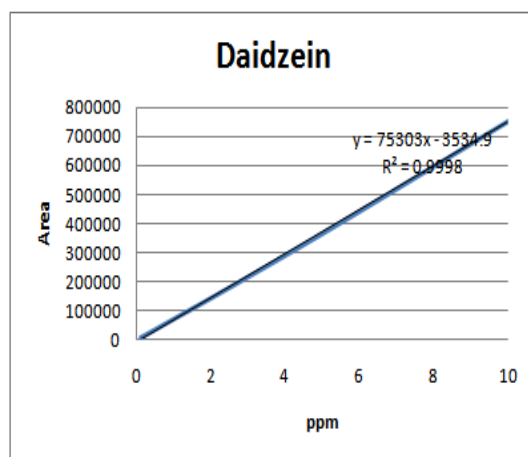


그림 29. Daidzein의 검량선

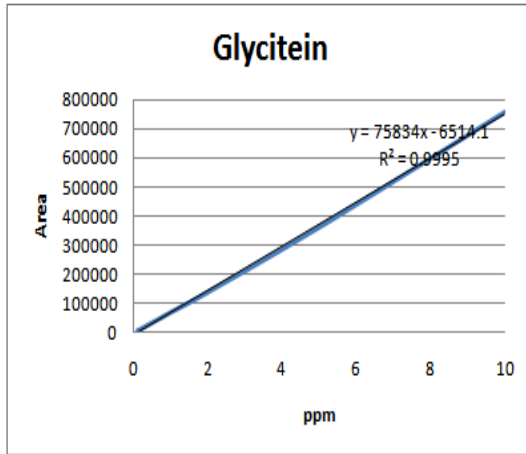


그림 30. Glycitein의 검량선

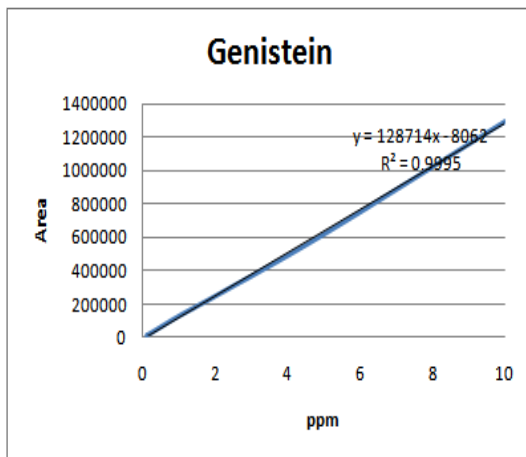


그림 31. Genistein의 검량선

④ 회수율

백태 및 쌀(일품미) 0.1g에 isoflavone 표준용액을 0.2 mg/kg이 되도록 처리한 다음 80% methanol 30 ml을 첨가하고 12시간동안 진탕 추출하였다. 추출물을 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 µm PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 µl씩 주입하여 HPLC로 분석하였다[그림 32-35].

분석법의 정확성(평균 회수율%)과 정밀성(C.V%)을 알아보기 위해 회수율 시험을 진행하였고 그 결과는 다음과 같다[표 8, 9]. LOQ 수준으로 첨가된 백태 시료 분석 결과 daidzin(138%)과 glycitein(123%)을 제외하고 76~115%의 양호한 회수율을 보였다. 정밀성도 glycitin(10.6%)을 제외하고 5% 미만으로 양호한 결과를 나타내었다. 일품미의 경우 LOQ 수준에서 3회 반복하여 분석한 결과 103~114%의 양호한 회수율을 보였고, 정밀성도 4% 미만으로 안정적인 결과를 나타냈다.

표 8. 백태의 회수율 결과

백태	Concentration			Recovery (%)			AVERAGE	STDEV	C.V.(%)
	1	2	3	1	2	3			
Daidzin	1.4	1.4	1.4	137.5	138.3	139.9	138.6	1.2	0.9
Glycitin	0.5	0.5	0.6	76.3	76.1	91.1	81.2	8.6	10.6
Genistin	1.9	1.8	1.9	115.6	109.6	119.5	114.9	5.0	4.4
Daidzein	0.2	0.2	0.2	77.0	76.0	76.0	76.3	0.6	0.8
Glycitein	0.2	0.2	0.2	123.5	124.5	122.5	123.5	1.0	0.8
Genistein	0.3	0.2	0.2	115.0	114.5	114.0	114.5	0.5	0.4

표 9. 일품미의 회수율 결과

일품미	Concentration			Recovery (%)			AVERAGE	STDEV	C.V.(%)
	1	2	3	1	2	3			
Daidzin	0.23	0.22	0.23	114.0	111.5	113.5	113.0	1.3	1.2
Glycitin	0.24	0.23	0.22	119.0	112.5	110.5	114.0	4.4	3.9
Genistin	0.21	0.21	0.21	105.5	102.5	103.0	103.7	1.6	1.6
Daidzein	0.22	0.21	0.21	107.5	104.0	105.5	105.7	1.8	1.7
Glycitein	0.22	0.22	0.21	107.5	107.5	107.0	107.3	0.3	0.3
Genistein	0.21	0.22	0.21	106.0	108.0	107.0	107.0	1.0	0.9

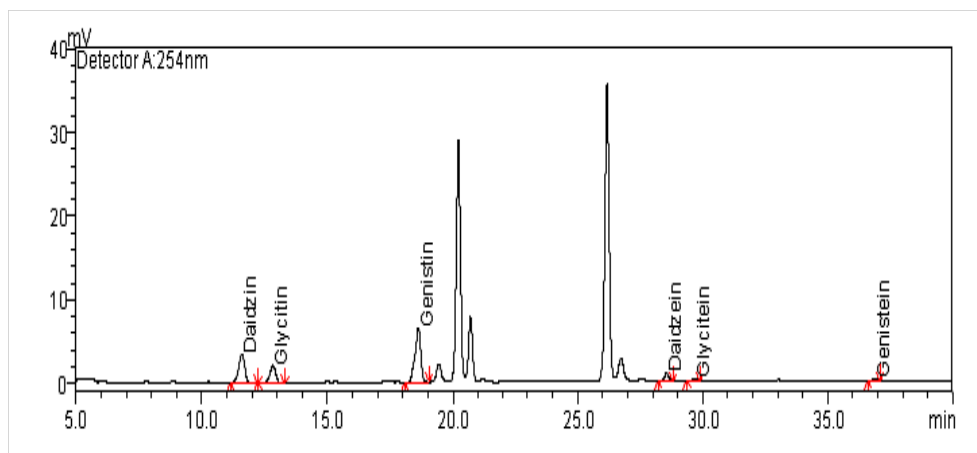


그림 32. 백태 control 크로마토그램

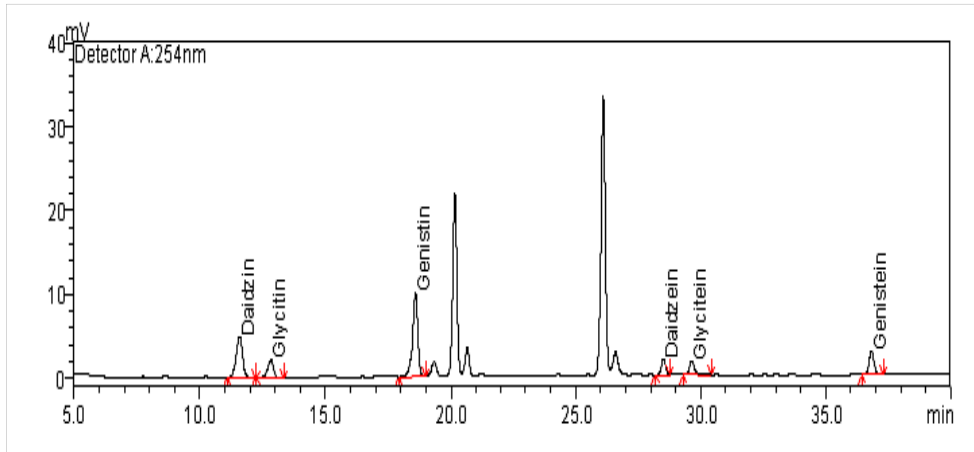


그림 33. 백태 회수율 크로마토그램(0.2ppm)

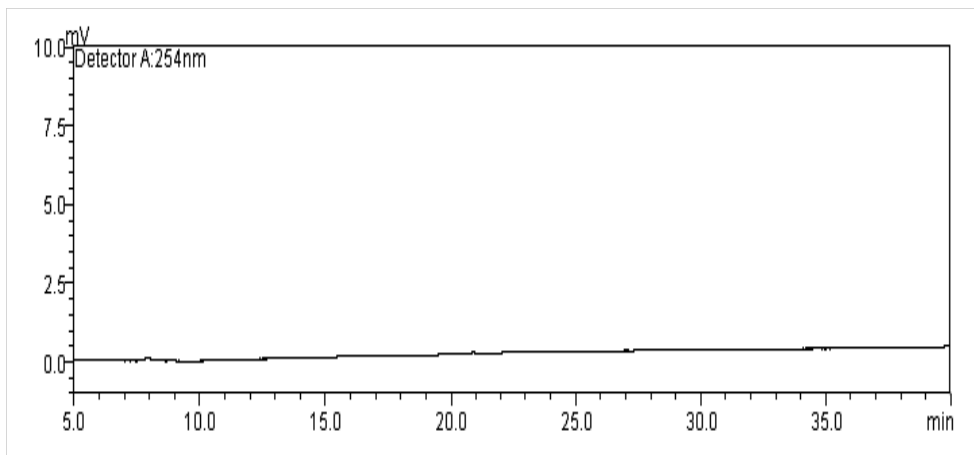


그림 34. 일품 control 크로마토그램

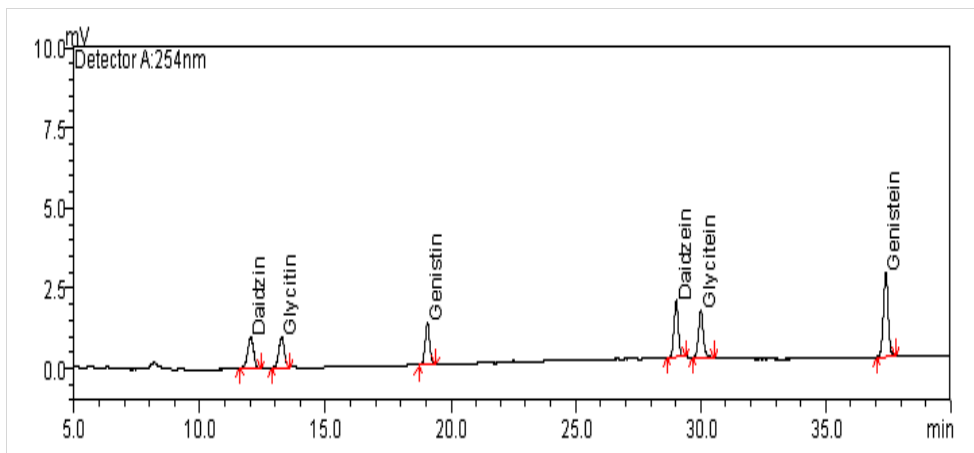


그림 35. 일품 회수율 크로마토그램(0.2ppm)

(라) Isoflavone의 최종 분석법을 이용한 시료분석 실험

※ 분석법 검증을 완료한 방법을 이용하여 콩(백태, 서리태) 및 쌀(일품미, 유색미)을 분석하여 적용성을 확인하였다.

① 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu HPLC
- Detector : Shimadzu UV detector (Wavelength; 254nm)
- Column : Shiseido C18 column, UG120 (250 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% acetic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% acetic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	15	85
5	15	85
20	25	75
40	40	60
45	100	0
50	15	85
60	15	85

- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

② 검량선 작성

Isoflavone 표준품 6종(Daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein) 각 1 mg을 각각 dimethylsulfoxide(DMSO) 1 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 100 μ l를 취하여 100% methanol 1 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 동량으로 혼합하여 mixture를 만들고 단계적으로 희석하여 10, 5, 2, 1, 0.2, 0.1 ppm 용액을 만들었다. 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 36].

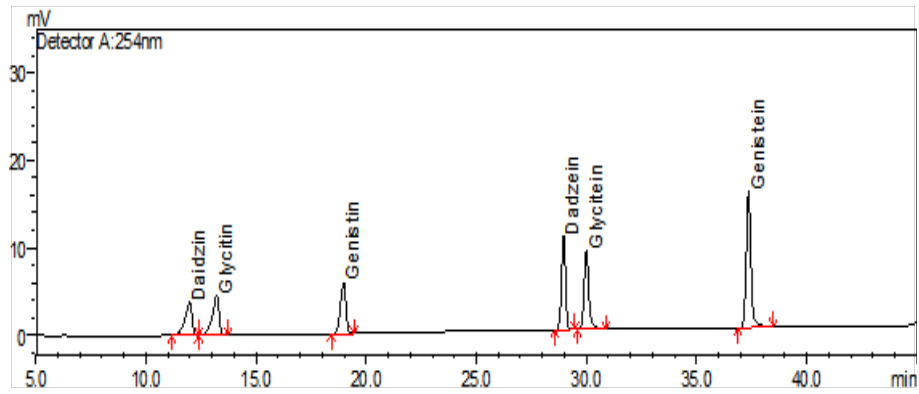


그림 36. Isoflavone 표준용액(2ppm) 분석 크로마토그램

③ 시료의 추출

분쇄한 콩 및 쌀 0.1 g에 80% methanol 30 ml를 가하고 250 rpm에서 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μ m PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 μ l씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

④ 콩 및 쌀 시료 분석 크로마토그램

검증된 분석법을 적용하여 콩 및 쌀 시료를 분석하였다. 백태와 서리태 추출물에서는 6가지 isoflavone이 모두 검출되었고, 총 isoflavone 함량은 각각 1373.4 μ g/g, 1157.4 μ g/g이었다[그림 37, 38; 표 10]. 그러나 유색미와 일품미에서는 isoflavone이 검출되지 않았다[그림 39, 40; 표 10].

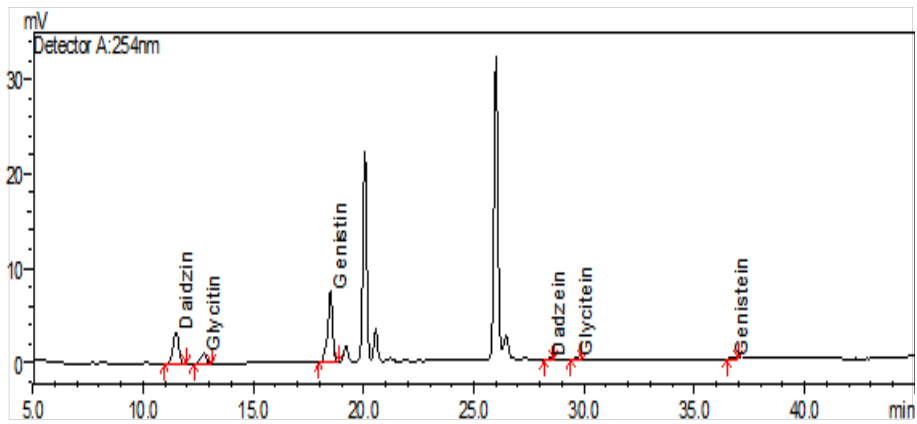


그림 37. 백태 시료 분석 크로마토그램

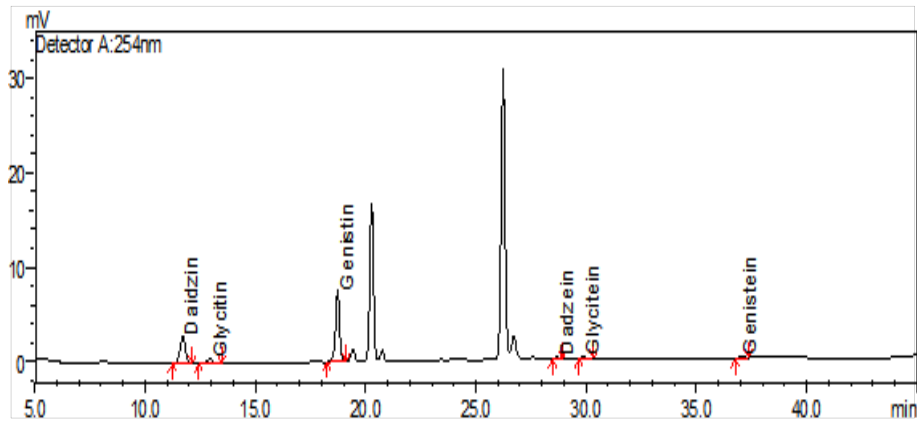


그림 38. 서리태 시료 분석 크로마토그램

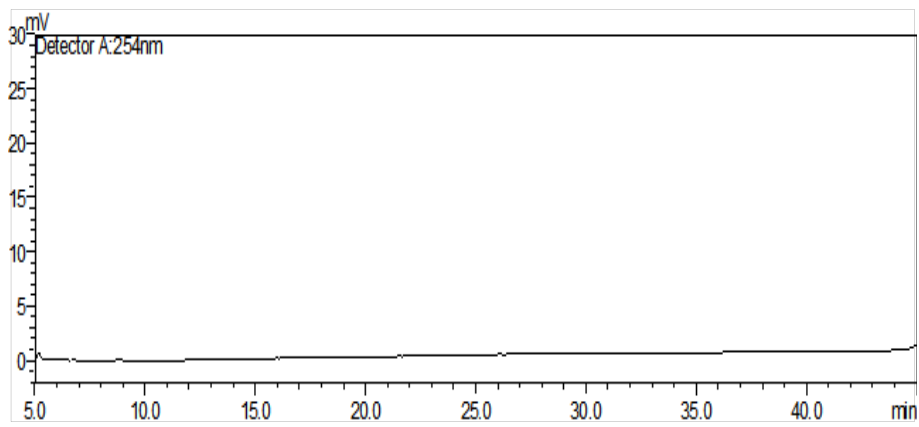


그림 39. 유색미 시료 분석 크로마토그램

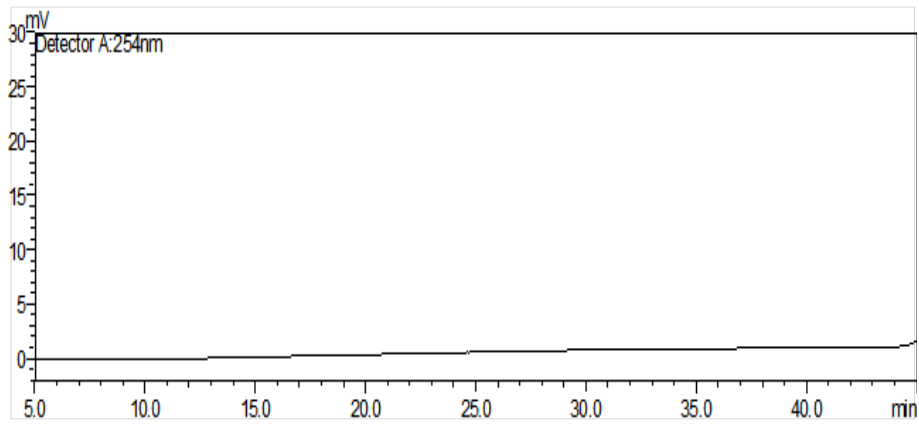


그림 40. 일품미 시료 분석 크로마토그램

표 10. Isoflavone 함량 분석 결과

Isoflavone 함량 (µg/g)							
	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total isoflavone
백태	448.5	168.3	655.2	9.3	52.2	39.9	1373.4
서리태	366.6	116.4	564.6	12.0	55.2	42.6	1157.4
유색미	0	0	0	0	0	0	0
일품미	0	0	0	0	0	0	0

(마) Isoflavone 성분 분석 기술 개선

※ 백태와 서리태에서 나타나는 isoflavone 중에서 확립된 6종을 제외하고 가장 많은 함량을 나타내는 malonylgenistin을 추가하여 7종 동시분석 기술을 확립하였다[표 11]. 최종 확립된 isoflavone 6종 동시분석 조건 중 이동상의 acetic acid를 formic acid로 변경하고 다른 추출방법 및 분석조건은 모두 동일하게 하였다.

① Isoflavone 7종의 구조 및 종류

표 11. Isoflavone 7종의 구조 및 종류

비 배당체(Aglycone) 형태	배당체(Glycone) 형태
Daidzein	Daidzin
Genistein	Genistin
Glycitein	Glycitin
	Malonylgenistin (추가)

② 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu 10Avp HPLC
- Detector : Shimadzu UV detector (Wavelength; 254nm)
- Column : Shiseido C18 column, UG120 (250 × 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% formic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% formic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	15	85
5	15	85
20	25	75
40	40	60
45	100	0
50	15	85
60	15	85

- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

③ 검량선 작성

Isoflavone 표준품 6종(Daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein) 각 1 mg을 각각 dimethylsulfoxide(DMSO) 1 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Malonylgenistin 표준품은 5 mg을 100% methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 만들었다. Stock solution 각각 100 μ l를 취하여 100% methanol 1 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 동량으로 혼합하여 mixture를 만들고 단계적으로 희석하여 10, 5, 2, 1, 0.2, 0.1 ppm 용액을 만들었다. 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 41-47].

④ 시료의 추출 및 분석

분쇄한 콩 0.1 g에 80% methanol 30 ml를 가하고 250 rpm에서 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μ m RC syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 μ l씩 주입하여 HPLC로 분석하였다[그림 48-50].

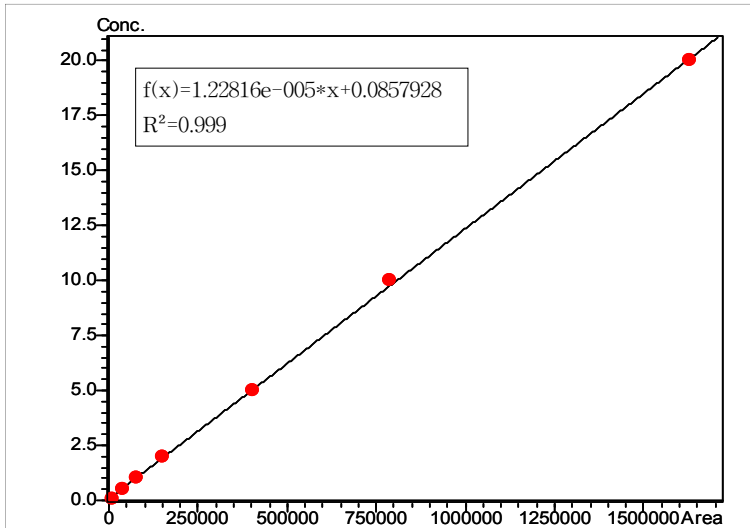


그림 41. Daidzin 검량선

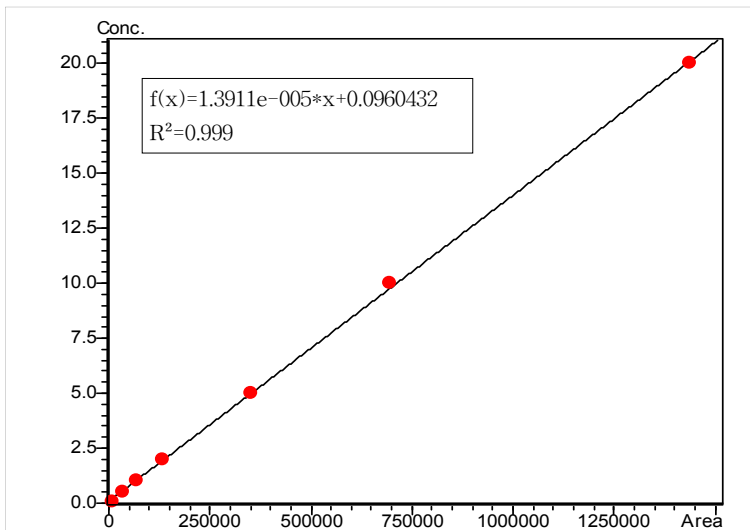


그림 42. Genistin 검량선

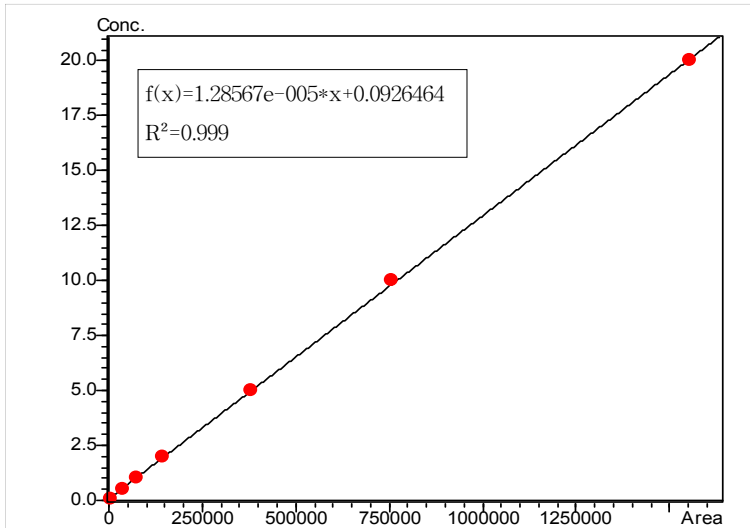


그림 43. Glycitin 검량선

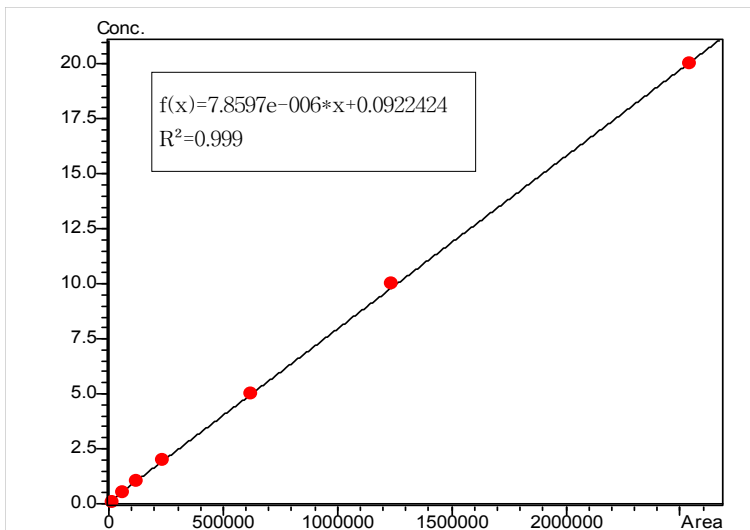


그림 44. Glycitin 검량선

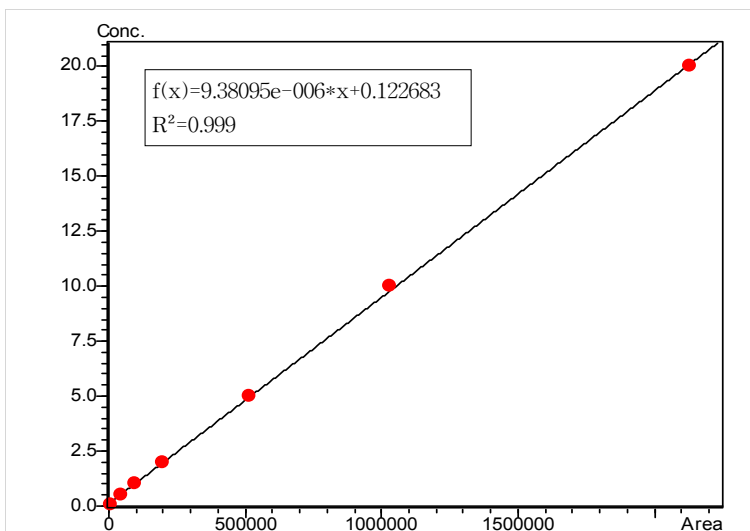


그림 45. Genistein 검량선

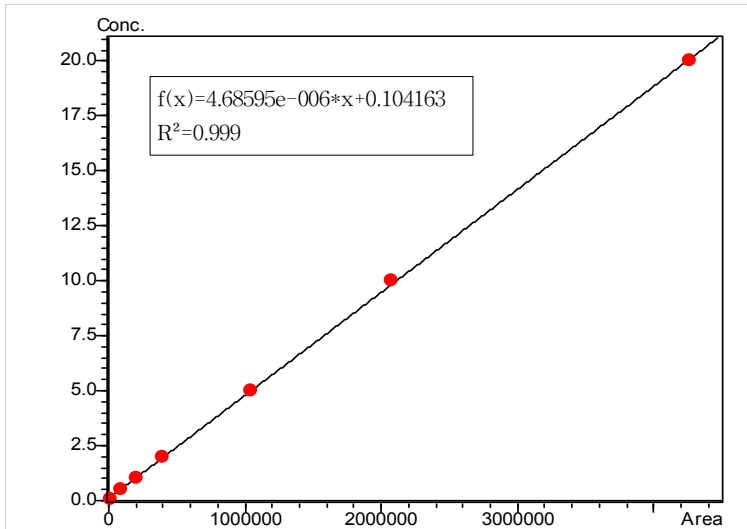


그림 46. Glycitein 검량선

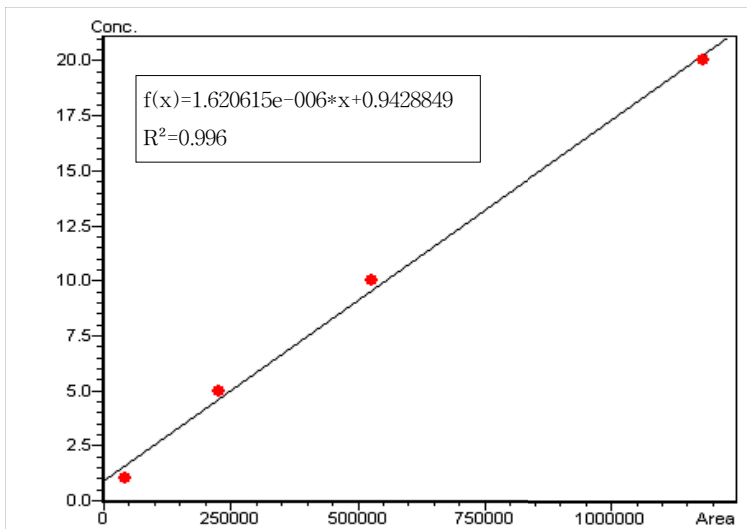


그림 47. Malonylglycitin 검량선

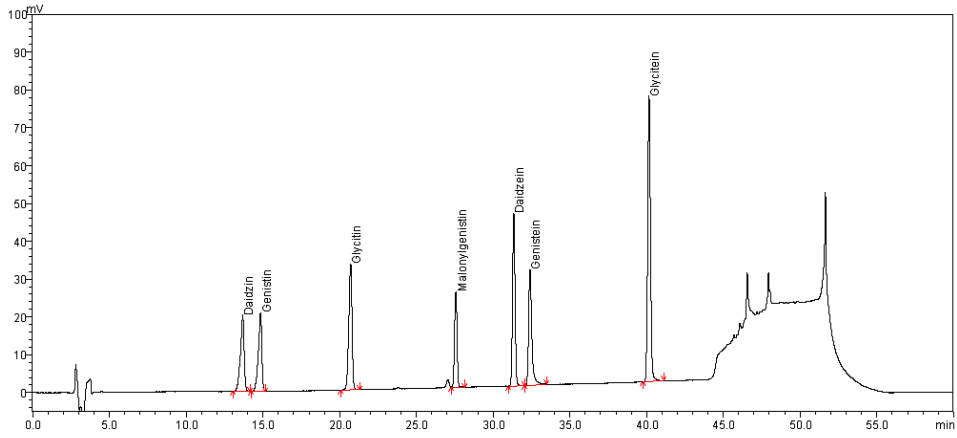


그림 48. Isoflavone 표준용액(5 ppm) 분석 크로마토그램

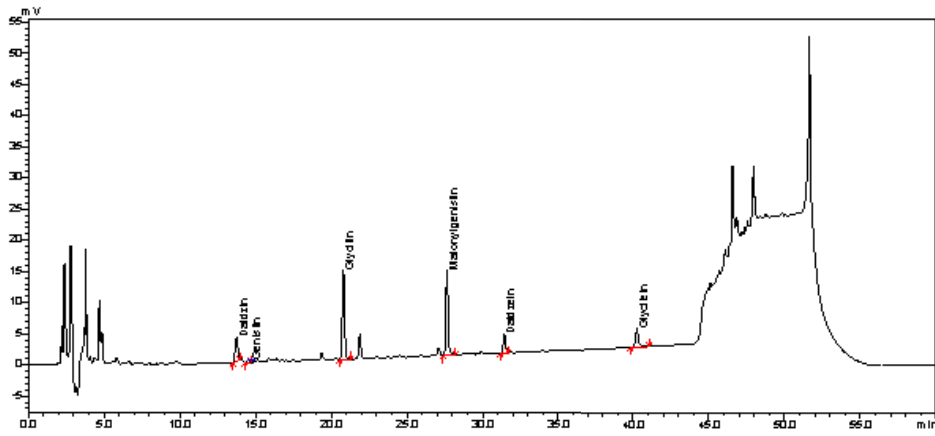


그림 49. 콩나물 시료 분석결과 크로마토그램

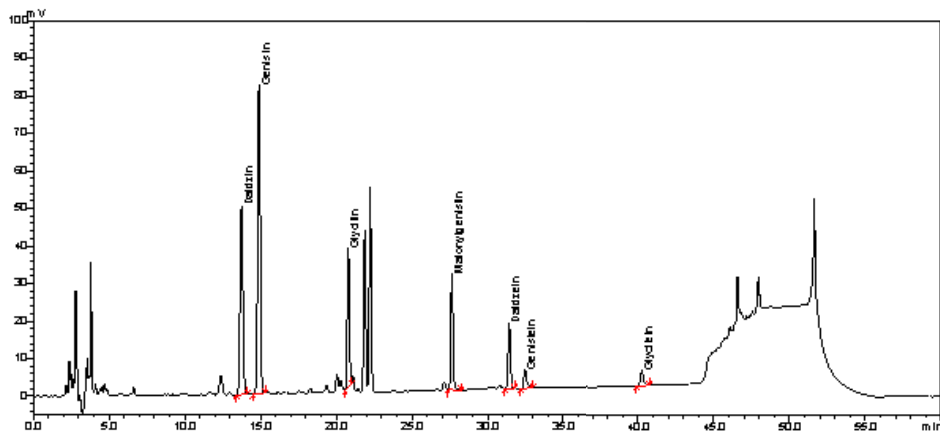


그림 50. 콩나물 시료 분석결과 크로마토그램

(바) LC-MS/MS를 이용한 Isoflavone 동시 분석법 확립 실험

▣ Isoflavone(6종) 동시 분석조건 확립을 위한 예비 실험

LC-MS/MS를 이용하여 isoflavone (6종) 분석을 위한 예비실험을 진행하였다. Total ion chromatogram 결과를 보면 aglycone 형태인 daidzein, genistein, glycitein은 확인되었지만 daidzin, genistin, glycitin과 같은 glucoside 형태는 나타나지 않았다[그림 51].

① 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Varian LC-MS system

(equiped with varian 212-LC chromatography pump, Model 410 autosampler, prostar 325 UV-Vis detector and 500-MS mass spectrometer)

- Isonization and analyzer type : ESI(electro spray ionization) and Ion trap
- Column : Thermo C18 column (150 X 2.1 mm, 3 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid
- Flow rate : 0.1ml/min
- Injection volume : 2 μ l
- Analytical conditions
 - Drying temperature : 350°C
 - Needle voltage : 5 kV
 - Capillary voltage : 80 V
 - Drying gas pressure (nitrogen) : 30 psi
 - Nebulizer gas pressure (nitrogen) : 40 psi

② Isoflavone(6종) 표준용액 분석 결과 크로마토그램 및 MS spectrum

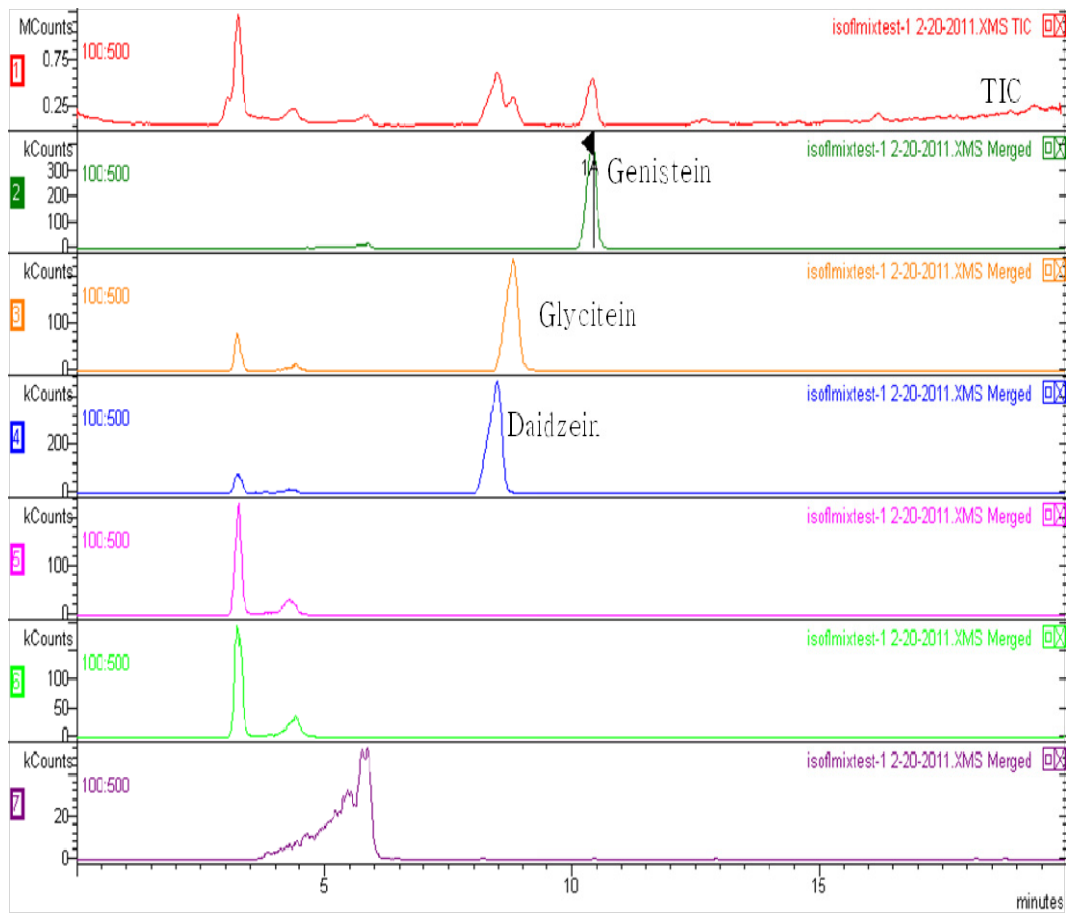


그림 51. Isoflavone (6종) 표준용액 분석 크로마토그램 (TIC)

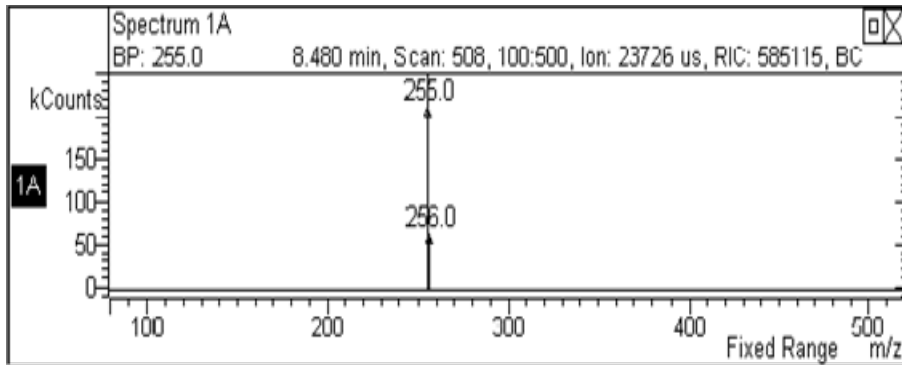


그림 52. Genistein MS spectrum

■ Isoflavone(7종) 동시 분석조건 확립 실험 (추가 분석 조건 확립)

HPLC-UV를 이용하여 malonylgenistin을 포함한 isoflavone 7종 동시분석 조건을 확립하였고 이를 LC-MS/MS에 적용하기 위한 실험을 진행하였다. Isoflavone 6종의 MS 분석을 위한 예비실험에서 Thermo C18 column을 사용하였을 때 그 결과가 좋지 않아 분석 컬럼을 YMC-Triart C18 column으로 변경하여 scan 분석 해보았다[그림 53-61].

① 분석기기 및 분석조건

- Instrument: Agilent 1100 HPLC+Varian 500MS system
- Ionization and analyzer type: ESI(electro spray ionization) and Ion trap
- Column: YMC-Triart C18 (100 × 2.0 mm I.D. S-3 um, 12 nm)
- Mobile phase
 - Solvent A: Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B: Acetonitrile + 0.1% formic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	85	15
2	85	15
20	75	25
40	60	40
45	100	100
50	85	15
60	85	15

- Flow rate: 0.2 mL/min
- Injection volume: 2 µL
- Analytical conditions
 - Scan range: 100-600 m/z
 - Drying temperature: 350 °C
 - Needle voltage: 3500 V
 - Capillary voltage: 80 V
 - Drying gas pressure (nitrogen) 30 psi
 - Nebulizer gas pressure (nitrogen) 40psi

② Isoflavone(7종) 표준용액 분석 결과 크로마토그램 및 MS spectrum

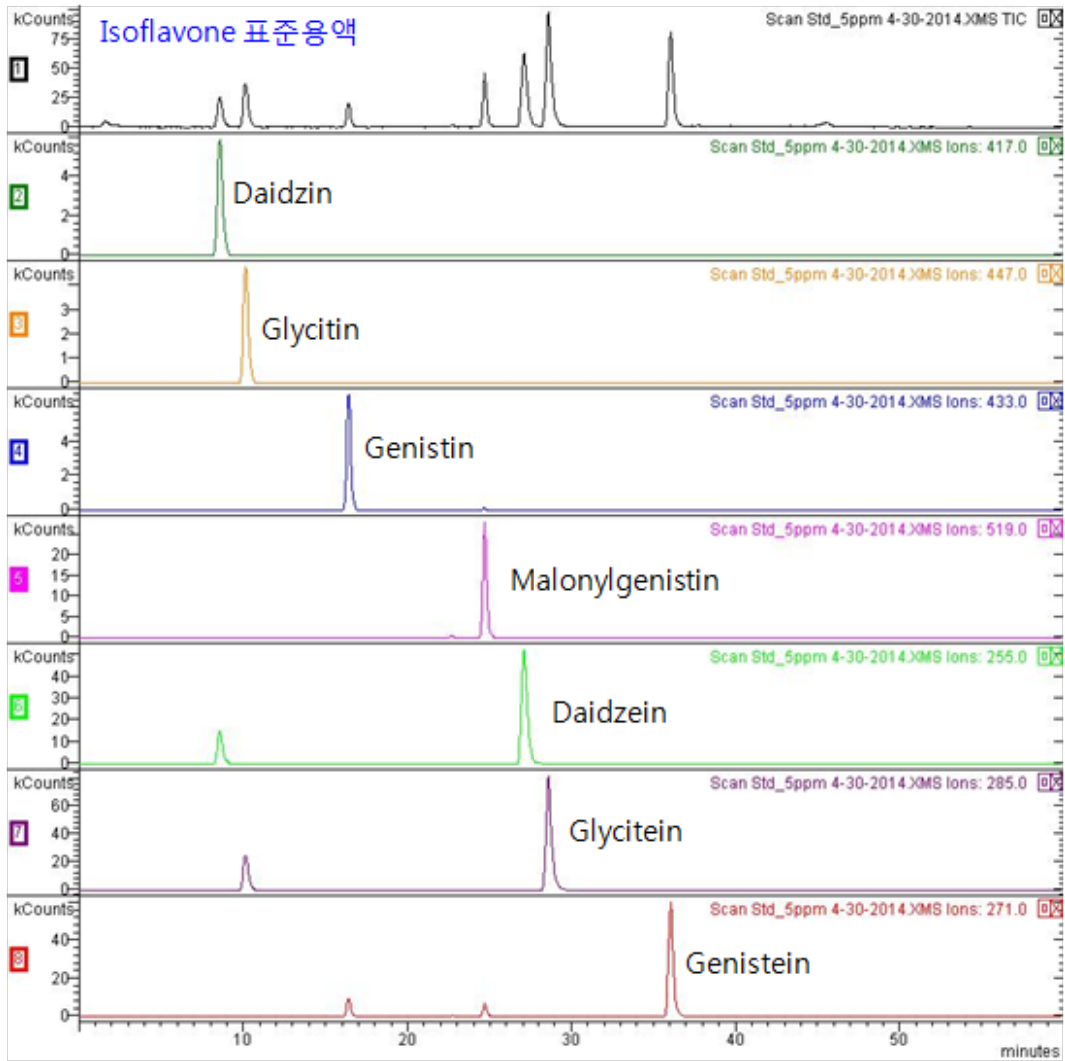


그림 53. Isoflavone 표준용액 (1 ppm) 분석 결과 크로마토그램 (TIC)

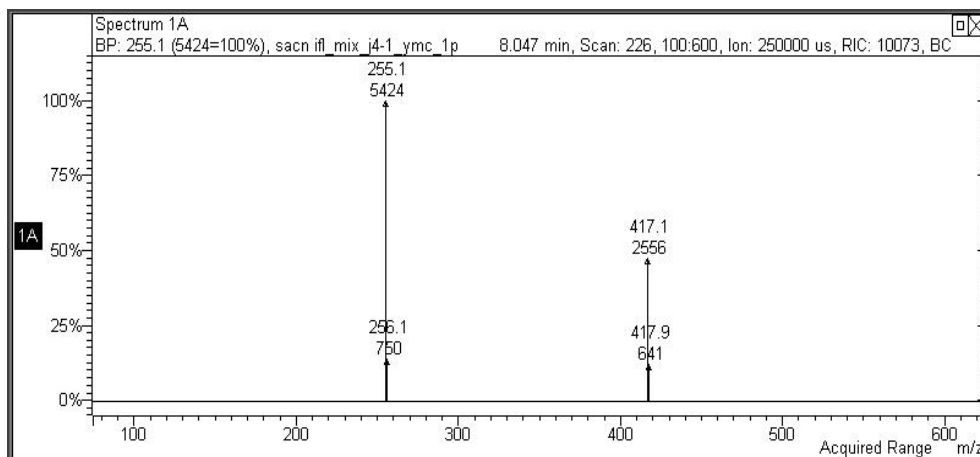


그림 54. Daidzin MS spectrum ($m/z = 417$)

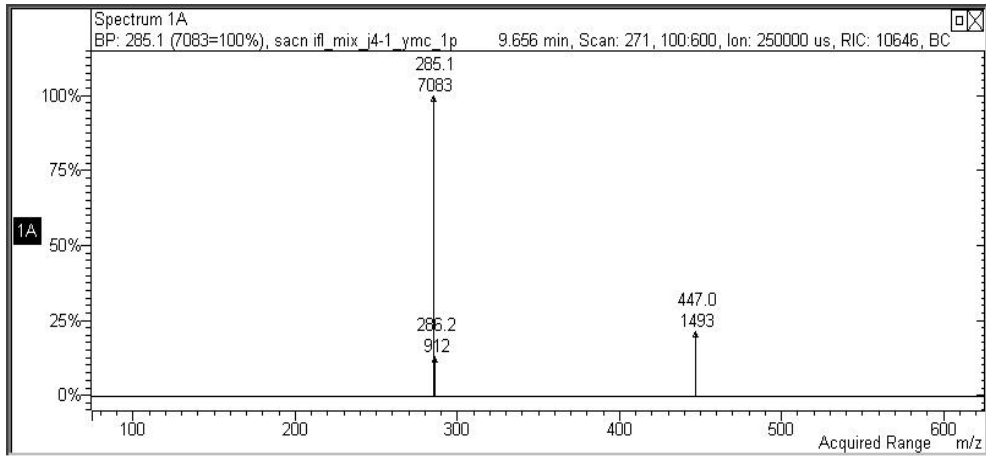


그림 55. Glycitin MS spectrum (m/z = 447)

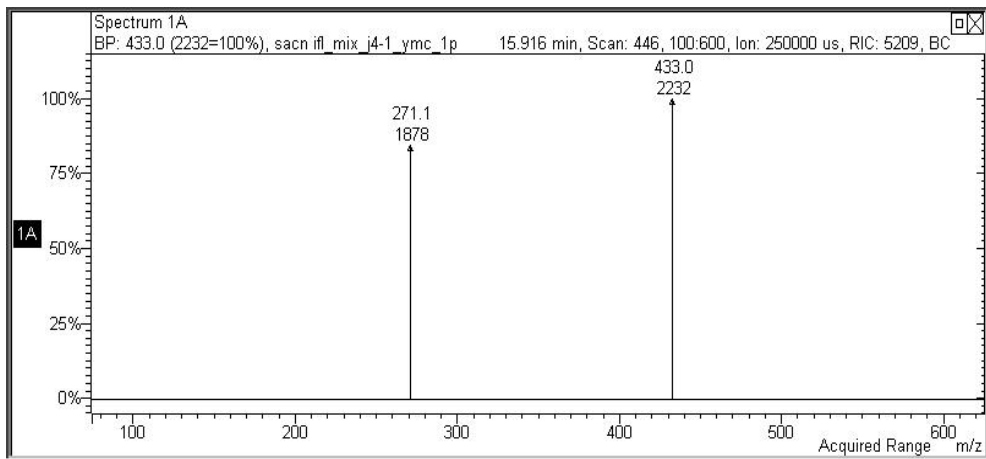


그림 56. Genistin MS spectrum (m/z = 433)

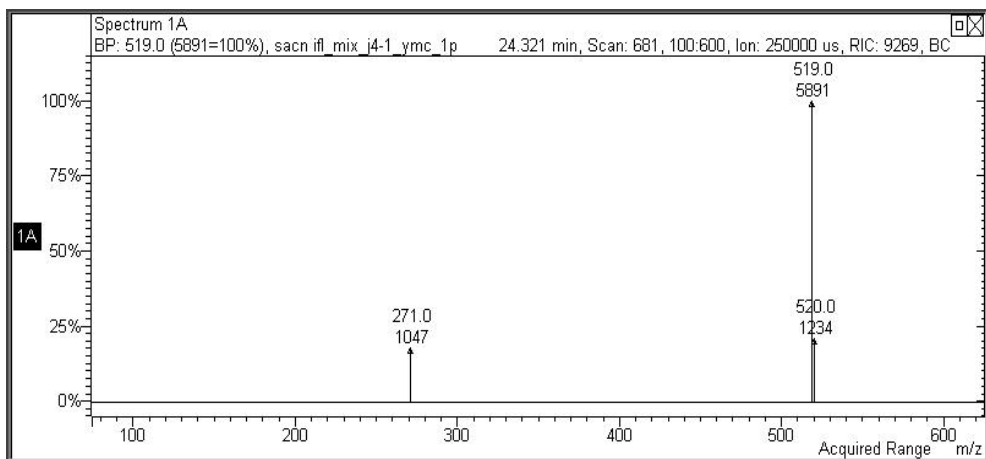


그림 57. Malonylgenistin MS spectrum (m/z = 519)

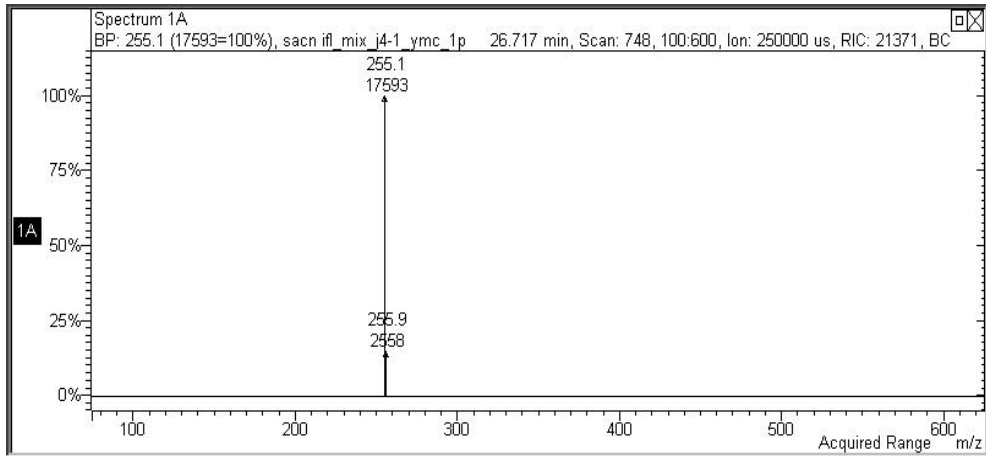


그림 58. Daidzein MS spectrum ($m/z = 255$)

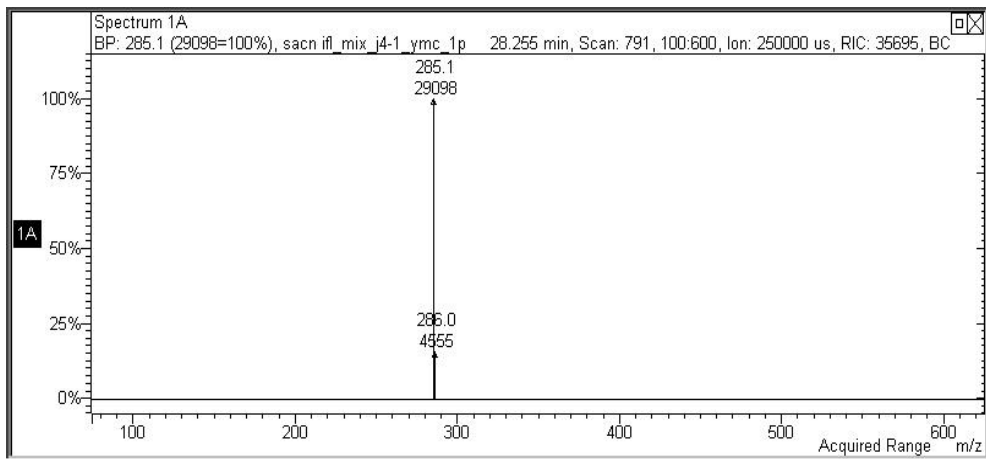


그림 59. Glycitein MS spectrum ($m/z = 285$)

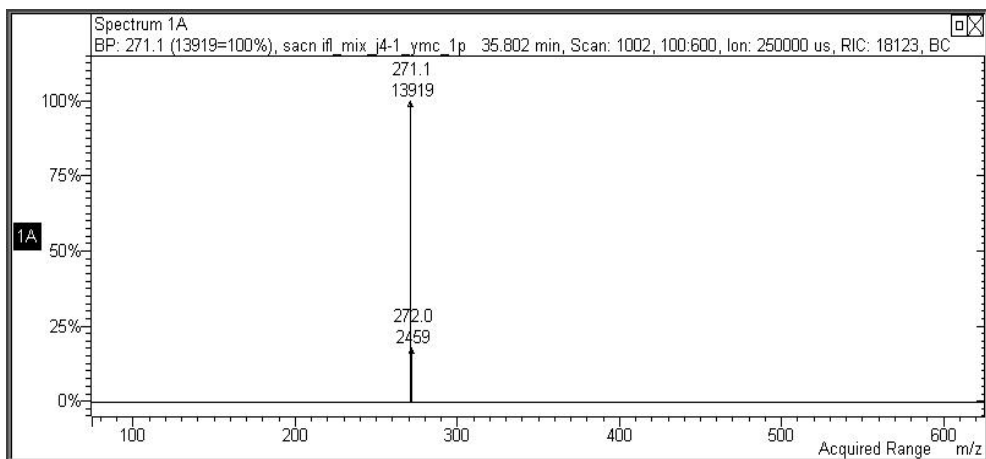


그림 60. Genistein MS spectrum ($m/z = 271$)

③ Isoflavone(7종) 콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램

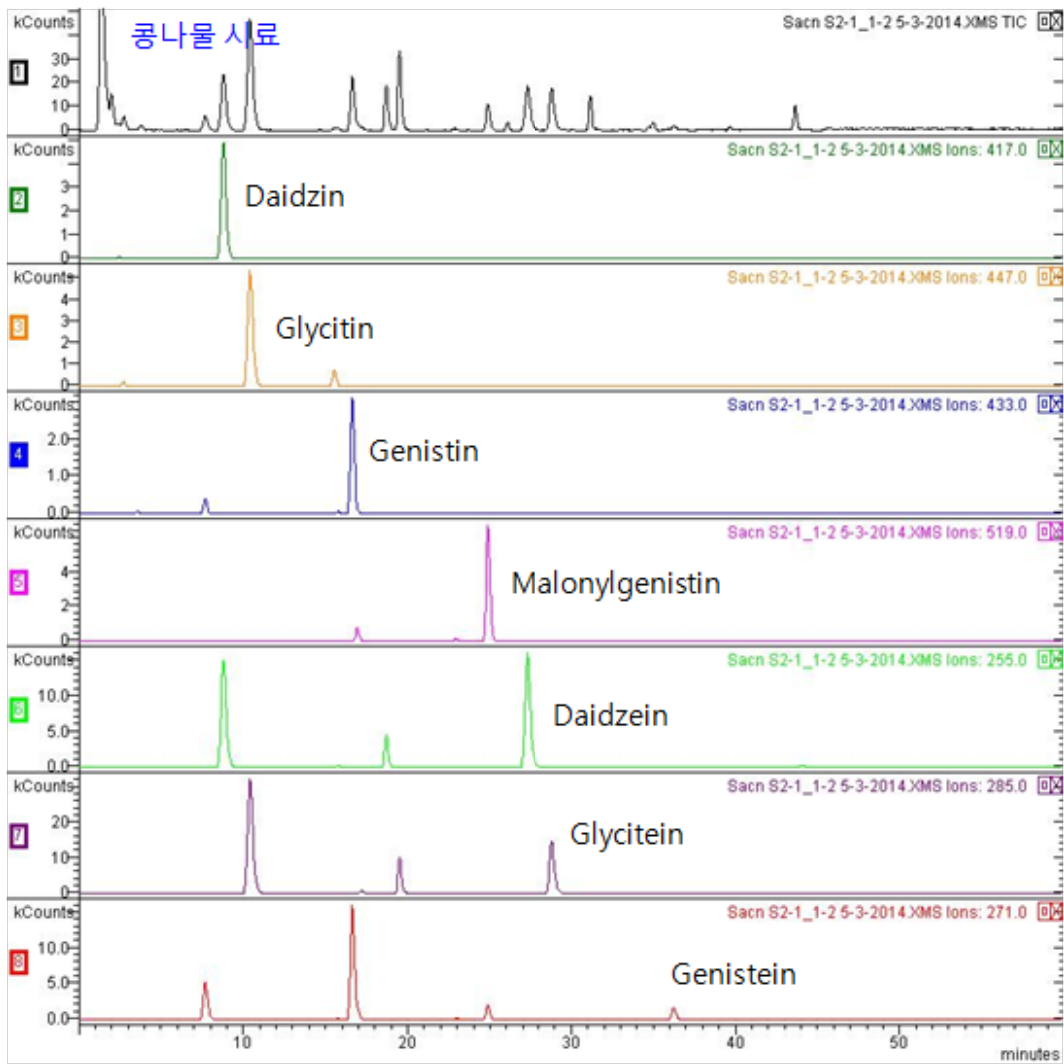
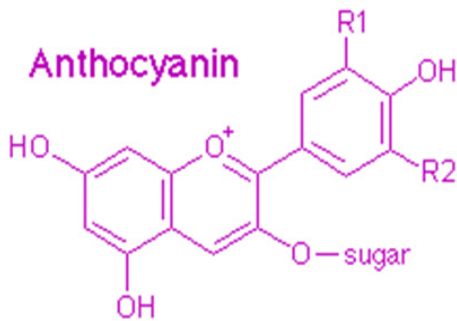


그림 61. 콩나물 시료 분석 결과

(2) 콩 및 쌀에 함유된 항산화물질인 anthocyanin의 동시 분석 정밀 분석법 개발

(가) Anthocyanin

Anthocyanin(배당체)은 anthocyanidin(비배당체)의 3번과 5번 위치의 수산기 하나, 또는 그 양쪽에 여러 가지 당(glucose, galactose, arabinose 등)이 단당이거나 혹은 소당으로 결합된 색소배당체를 말한다[그림 62, 표 12]. Anthocyanidin에는 6개의 기본구조가 있으며, 그 색은 3번과 5번 위치에 수산기(-OH)의 수가 많을수록 청(자)색이, 메톡실기(-OCH3)의 수가 많을수록 적색이 짙어진다.



R1, R2 = H, OH, OCH₃

Sugar = glucose, arabinose, galactose

그림 62. Anthocyanin 기본 구조

Anthocyanidin	R1	R2	Anthocyanin	R1	R2
Cyanidin	-OH	-H	Cyanidin-3-glucoside(C3G)	-OH	-H
Delphinidin	-OH	-OH	Delphinidin-3-glucoside(D3G)	-OH	-OH
Pelargonidin	-H	-H	Pelargonidin-3-glucoside(Pg3G)	-H	-H
Malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃	Malvidin-3-glucoside(Mv3G)	-OCH ₃	-OCH ₃
Peonidin	-OCH ₃	-H	Peonidin-3-glucoside(Pn3G)	-OCH ₃	-H
Petunidin	-OH	-OCH ₃	Petunidin-3-glucoside(Pt3G)	-OH	-OCH ₃

Anthocyanin은 그리스어로 꽃을 뜻하는 anthos와 청색을 뜻하는 cyanins에서 유래된 수용성 색소이다. 모든 고등식물의 꽃, 과일, 잎, 줄기에서 존재하는데 주로 표피같은 세포 외층에서 발견된다. 그 이유는 anthocyanin 생합성 시 식물의 광합성으로부터 유도된 화학물질을 필요로 하기 때문이다. Anthocyanin은 cyanidin, delphinidin, petunidin, pelargonidin, malvidin의 배당체 형태로 존재한다. 식물에 존재하는 안토시아닌은 강한 자외선으로부터 세포의 DNA 손상을 막아주어 식물을 보호한다. 그리고 특정 빛을 흡수하여 색을 만들어 곤충이나 동물을 유인하고, 식물이 재 생산하는 것을 돕기도 한다. 현재까지 약 250개의 anthocyanin이 알려져 있다.

식물의 잎과 줄기 같은 광합성 조직에서 anthocyanin은 청색에서 녹색, 그리고 자외선 흡수에 의한 손상, 광저해, 스트레스 자극으로부터 세포를 보호하는 “선크림”과 같은 역할을 한다. 또한 light-attenuator로 작용할 뿐 아니라 강력한 항산화제로 작용한다.

Anthocyanin은 항암작용 및 항당뇨 작용이 있고, 동맥에 침전물 형성을 억제하여 심장 질환 및 뇌졸중 위험을 감소하는 효과가 있다. 또한 아스피린의 10배에 해당하는 강력한 소염 및 살균작용을 하고, 노화를 방지한다. 그밖에 로돕신의 재합성을 촉진하여 시

력을 회복시키고, 콜레스테롤을 감소시키는 효과가 있다.

(나) Anthocyanin 분석법 확립

※ 본 연구에서는 중요한 배당체 6종 (Delphinidin-3-glucoside; D3G, Cyanidin-3-glucoside; C3G, Petunidin-3-glucoside; Pt3G, Peonidin-3-glucoside; Pn3G, Pelagonidin-3-glucoside; Pg3G, Malvidin-3-glucoside; Mv3G)의 동시분석법을 개발하였다.

※ 콩 및 쌀에 함유된 anthocyanin 성분을 분석하기 위하여 M.G. Choung. (2008) 방법을 참고하였다.

① 표준품 제조

Anthocyanin 표준품 (D3G, C3G, Pt3G, Pg3G, Pn3G, Mv3G) 각 5 mg을 각각 1%HCl - 20%methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 1%HCl - 20%methanol 10 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 동량으로 혼합하여 mixture를 만들고 단계적으로 희석하여 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 63].

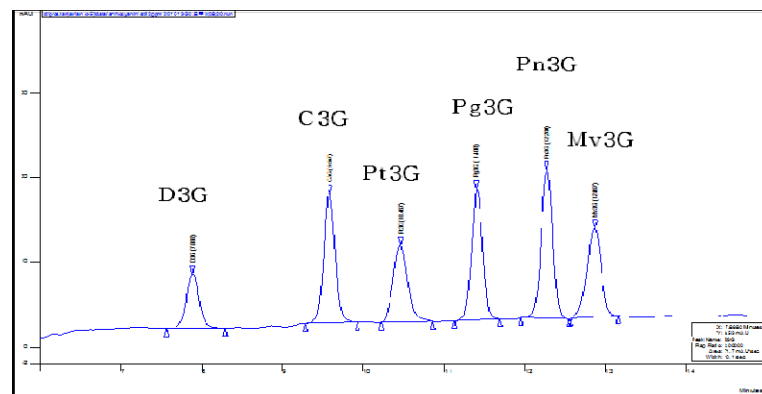


그림 63. Anthocyanin 표준용액(1ppm)의 크로마토그램

② 표준품 UV spectra

광다이오드 검출기를 사용(파장범위; 200~600 nm)하여 anthocyanin 6종의 최대 흡광 파장을 확인하였고 동시분석에 사용할 파장을 520 nm로 결정하였다[그림 64].

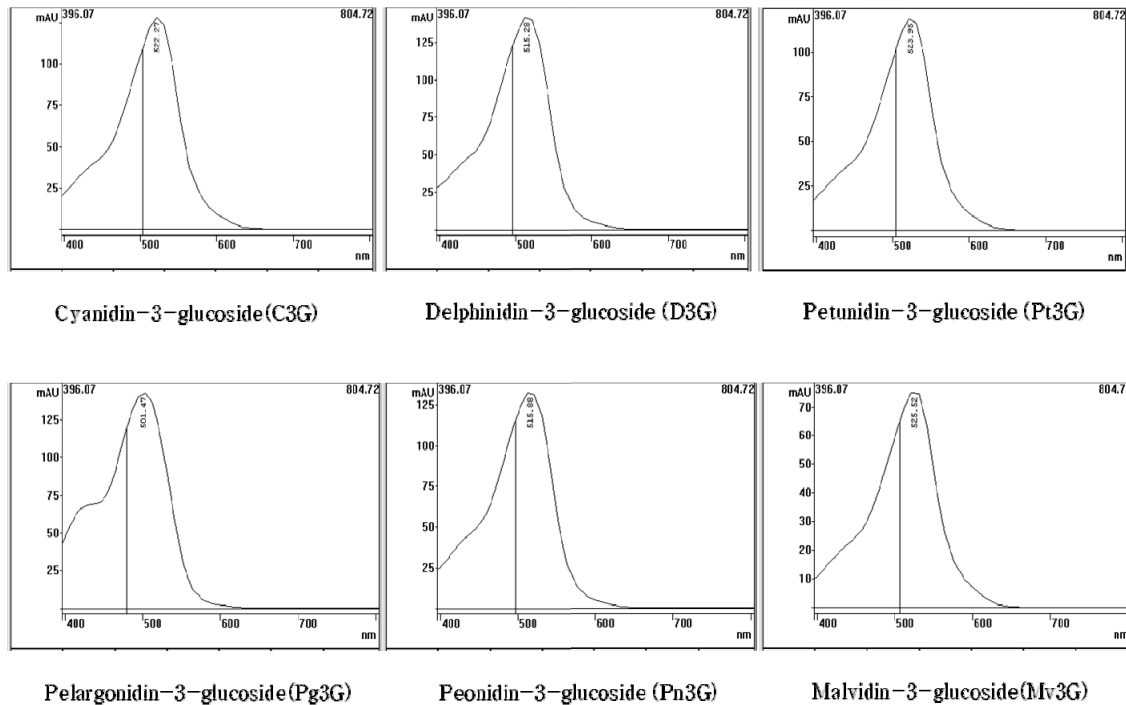


그림 64. Anthocyanin 6종의 UV spectrum

③ 시료의 추출

※ 분석법 검증을 위해 시료에 존재하는 anthocyanin을 1차로 분석하여 회수율 시험에 이용하였다.

※ 분쇄한 콩 및 유색미 각 0.1 g에 1%HCl-20%methanol 30 ml를 가하고 250 rpm에서 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μm PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 μl씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

④ 시료 분석 및 크로마토그램

㉞ Anthocyanin 함량

콩 및 쌀 시료에서 분석한 anthocyanin 함량은 표 13과 같다. 검정콩(서리태) 시료의 경우 D3G가 397.5 μg/g, C3G가 897.7 μg/g이었고 총 anthocyanin 함량은 1295.2 μg/g을 나타냈다[그림 65]. 그런데 종피 부분만 분석했을 때 D3G가 4339.9 μg/g, C3G가 6812.2 μg/g이었고 총 anthocyanin 함량은 12113.6 μg/g으로 검정콩 전체 함량에 비해 10배 정도 높게 나타났다. 또한 종피에서는 Pt3G, Pg3G, PnG, Mv3G가 나타난 것을 확인하였다[그림 66]. 백태의 경우 anthocyanin 6종이 모두 검출되지 않았다[그림 67]. 쌀 시료의 경우 일품미에서는 anthocyanin 성분이 나타나지 않았고, 유색미에서 C3G(517.7 μg/g)만 관찰되었다[그림 68, 69].

표 13. Anthocyanin 함량 결과

Anthocyanin 함량 (µg/g)							
	D3G	C3G	Pt3G	Pg3G	Pn3G	Mv3G	Total Anthocyanin
서리태	397.5	897.7	ND	ND	ND	ND	1295.2
서리태 (종피)	4339.9	6812.2	603.1	173.7	117.4	67.3	12113.6
유색미	ND	517.7	ND	ND	ND	ND	517.7
백태	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
일품미	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0

ND; not detectable

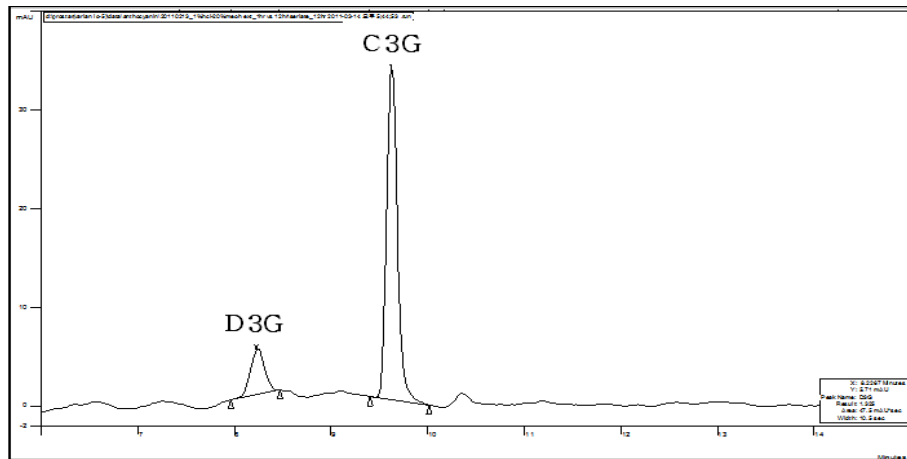


그림 65. 서리태 시료 분석 크로마토그램

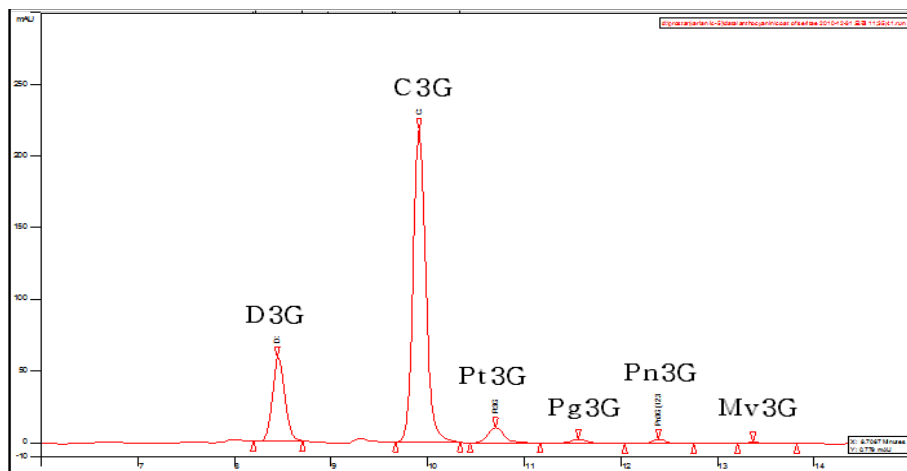


그림 66. 서리태(종피) 시료 분석 크로마토그램

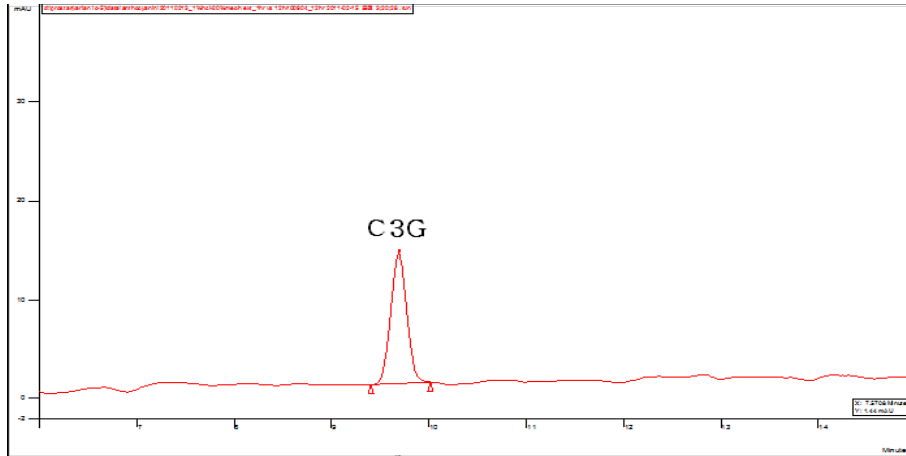


그림 67. 유색미(서농15호) 시료 분석 크로마토그램

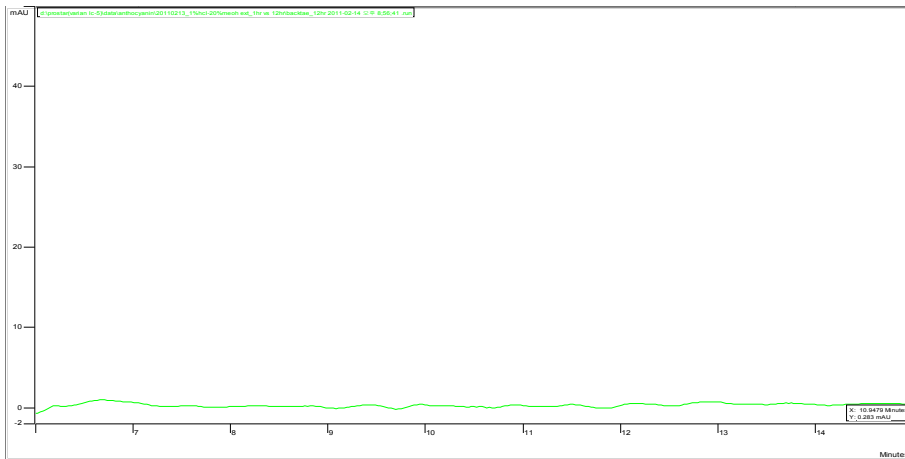


그림 68. 백태 시료 분석 크로마토그램

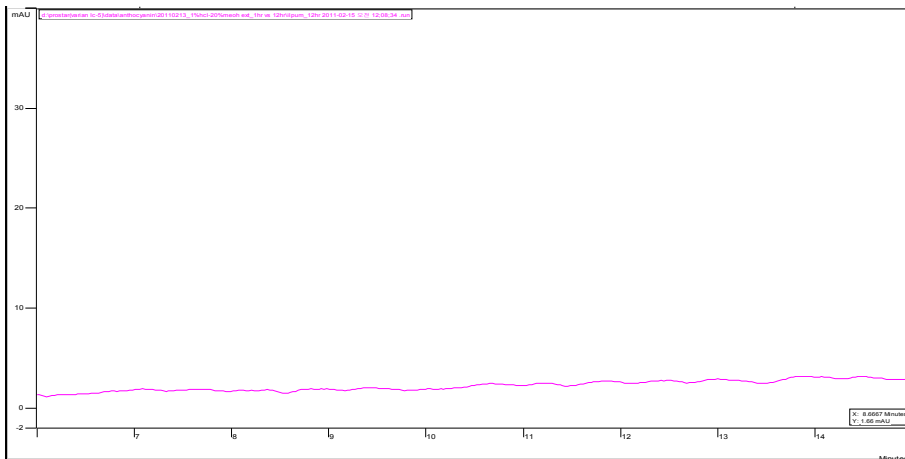


그림 69. 일품미 시료 분석 크로마토그램

⑤ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Varian ProStar HPLC (USA)
- Detector : Photodiodearray detctor (Wavelength; 520nm)
- Column : Shiseido C18 column (250 × 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 5% formic acid
 - Solvent B : DW + 5% formic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	10	90
35	40	60
36	10	90
46	10	90

- Flow rate : 0.7 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

(다). Anthocyanin 분석법 검증

① 정량한계, 검출한계

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 분석기기의 감도를 검증할 수 있는데, 다양한 농도의 표준용액을 분석하여 S/N(signal과 noise 비율)을 구한결과는 다음과 같다[표 14]. 검출한계는 S/N>3~5배, 정량한계는 S/N>10배(LOD의 3~5배 이상)로 하였다.

표 14. Anthocyanin 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

Anthocyanins	D3G	C3G	Pt3G	Pg3G	Pn3G	Mv3G
LOD(ng)	4	4	4	4	4	4
LOQ(ng)	20	20	20	20	20	20

② 재현성

분석의 재현성 시험은 일정한 양의 표준품을 7번 이상 반복 주입 분석하여 머무름 시간(t_R), peak의 면적(Area)의 오차를 조사하는데, 전체적으로 분석기기의 안정성을 알아보기 위해 수행한다. 본 연구에서 설정한 정량한계의 양(LOQ, 10LOQ 수준으로 진행)을 연속으로 7번 분석한 결과, t_R , area의 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다[표 15].

표 15. Anthocyanin의 재현성 실험 결과

Anthocyanins			D3G	C3G	Pt3G	Pg3G	Pn3G	Mv3G
LOQ N=7	t _R	Average	8.0	9.7	10.6	11.7	12.7	13.4
		C.V	0.8	0.9	0.7	0.8	0.5	0.4
	Area	Average	181734.6	377498.7	277446.4	332905.1	376931.9	262892.9
		C.V	5.1	4.7	6.3	2.2	3.7	4.1
10LOQ N=7	t _R	Average	7.9	9.8	10.7	11.9	12.7	13.6
		C.V	0.6	1.2	1.2	1.2	1.2	0.8
	Area	Average	3147184.9	3823701.4	3479513.4	3500578.0	3907838.9	2668617.0
		C.V	2.8	1.3	1.3	3.7	0.6	1.0

③ 직선성

㉠ 표준용액 조제

Anthocyanin 표준품(D3G, C3G, Pt3G, Pg3G, Pn3G, Mv3G) 각 5 mg을 각각 1%HCl - 20%methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 1%HCl - 20%methanol 10 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 동량으로 혼합하여 mixture를 만들고 단계적으로 희석하여 20, 10, 5, 2, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μl씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

㉡ Anthocyanin 표준용액 (1~20 ppm) 검량선의 직선성 시험

Anthocyanin 표준용액 (1~20 ppm)을 분석하여 얻은 검량선은 R²=0.99 이상으로서 직선성이 우수함을 확인하였다[그림 70-75].

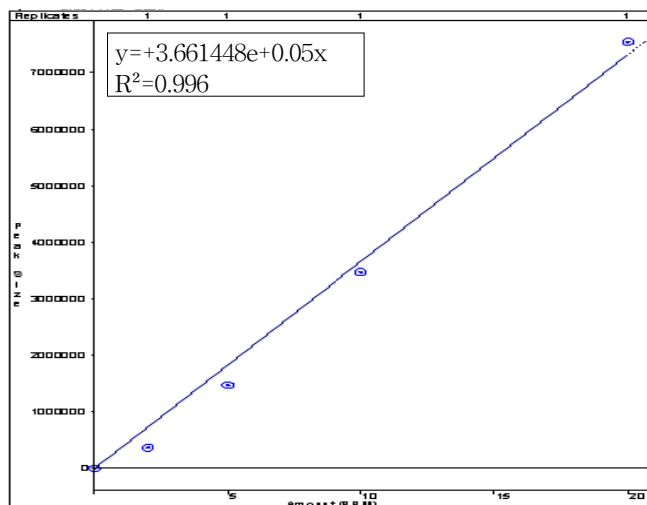


그림 70. Delphinidin-3-glucoside(D3G)의 검량선

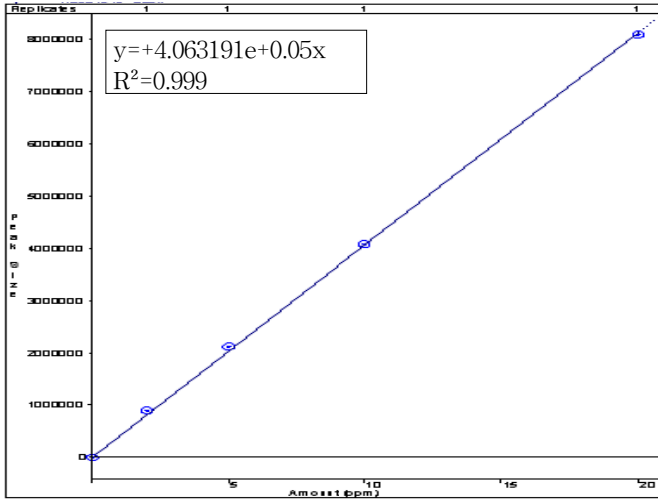


그림 71. Cyanidin-3-glucoside(C3G)의 검량선

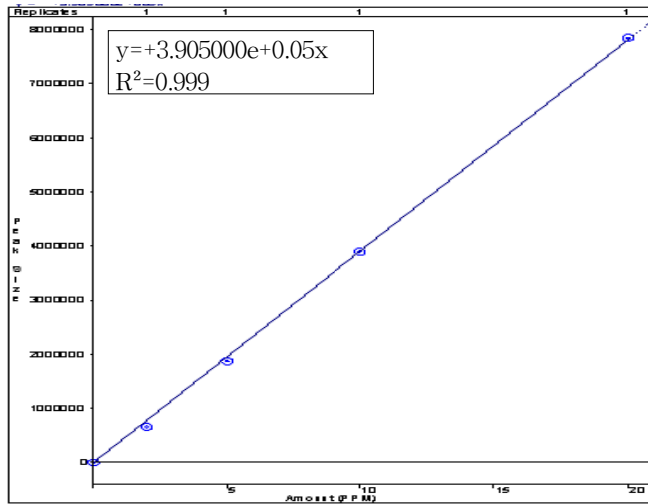


그림 72. Petunidin-3-glucoside(Pt3G)의 검량선

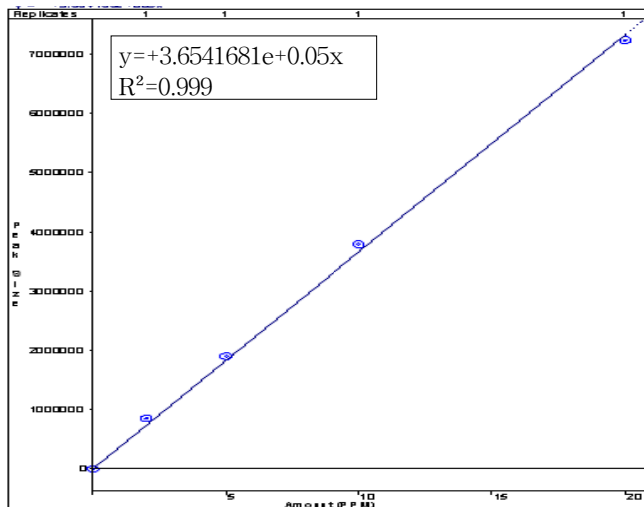


그림 73. Pelagonidin-3-glucoside(Pg3G)의 검량선

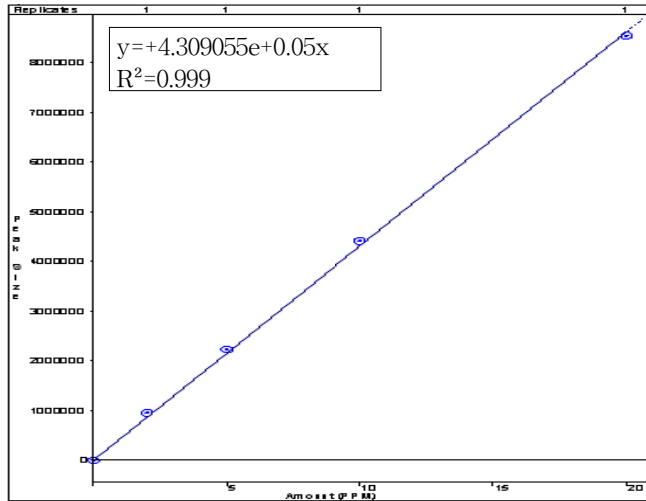


그림 74. Peonidin-3-glucoside(Pn3G)의 검량선

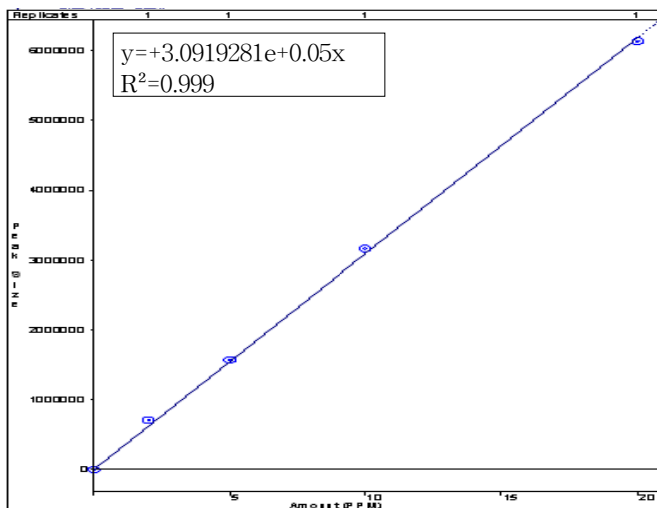


그림 75. Malvidin-3-glucoside(Mv3G)의 검량선

④ 회수율

콩 및 쌀 0.1g에 anthocyanin 표준용액을 1.0 mg/kg이 되도록 처리한 다음 80% methanol 30 ml을 첨가하고 12시간동안 진탕 추출하였다. 추출물을 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μm PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 μl씩 주입하여 HPLC로 분석하였다[그림 76-79].

분석법의 정확성(평균 회수율%)과 정밀성(C.V%)을 알아보기 위해 회수율 시험을 진행하였고 그 결과는 다음과 같다[표 16, 17]. 백태 및 일품미 시료에 각각 anthocyanin 표준용액을 LOQ 수준으로 3반복 처리하여, 확립된 전체 분석과정을 거친 후, 회수율을 산출한 결과 백태가 35~52%였고, 정밀성은 D3G를 제외하고 약 1~12%로 나타났다. 일품미의 경우 LOQ 수준에서 3회 반복하여 분석한 결과 78~94%의 양호한 회수율을 보였고, 정밀성도 6% 미만으로 안정적인 결과를 나타냈다.

표 16. 백태의 회수율 결과

백태	Concentration			Recovery (%)			AVERAGE	STDEV	C.V. (%)
	1	2	3	1	2	3			
D3G	0.65	0.43	0.48	61.95	40.95	45.94	49.62	10.97	22.11
C3G	0.59	0.57	0.50	56.57	54.17	47.70	52.82	4.59	8.68
Pt3G	0.42	0.42	0.48	40.06	40.06	45.77	41.96	3.30	7.86
Pg3G	0.58	0.47	0.49	55.50	44.98	46.62	49.03	5.66	11.55
Pn3G	0.48	0.49	0.50	46.17	46.30	47.63	46.70	0.81	1.72
Mv3G	0.35	0.35	0.41	33.66	33.14	38.62	35.14	3.02	8.61

표 17. 일품미의 회수율 결과

일품미	Concentration			Recovery (%)			AVERAGE	STDEV	C.V. (%)
	1	2	3	1	2	3			
D3G	0.95	0.95	0.95	90.41	90.14	90.90	90.49	0.39	0.43
C3G	0.88	0.88	0.83	83.90	83.34	79.13	82.12	2.60	3.17
Pt3G	0.83	0.84	0.81	79.41	79.74	77.23	78.79	1.37	1.73
Pg3G	1.00	0.97	1.00	95.18	92.49	95.46	94.37	1.64	1.74
Pn3G	0.97	1.03	0.93	92.13	98.48	88.81	93.14	4.91	5.27
Mv3G	0.86	0.83	0.83	81.55	79.45	78.70	79.90	1.48	1.85

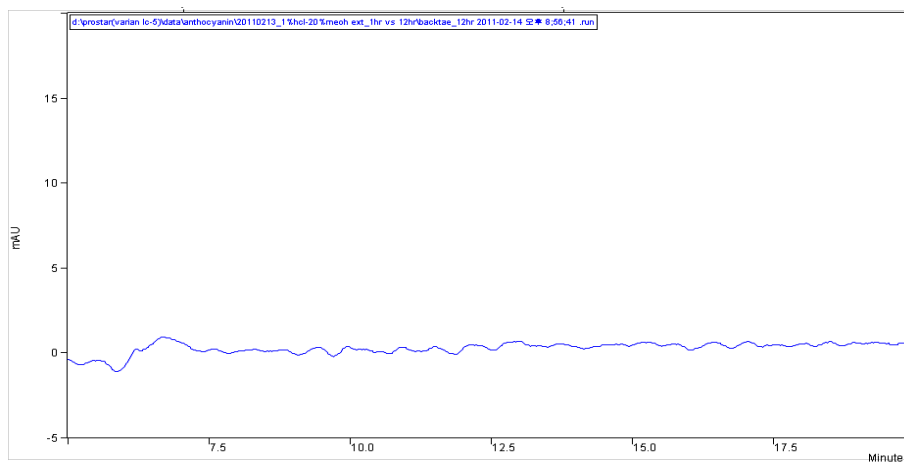


그림 76. 백태 control 크로마토그램

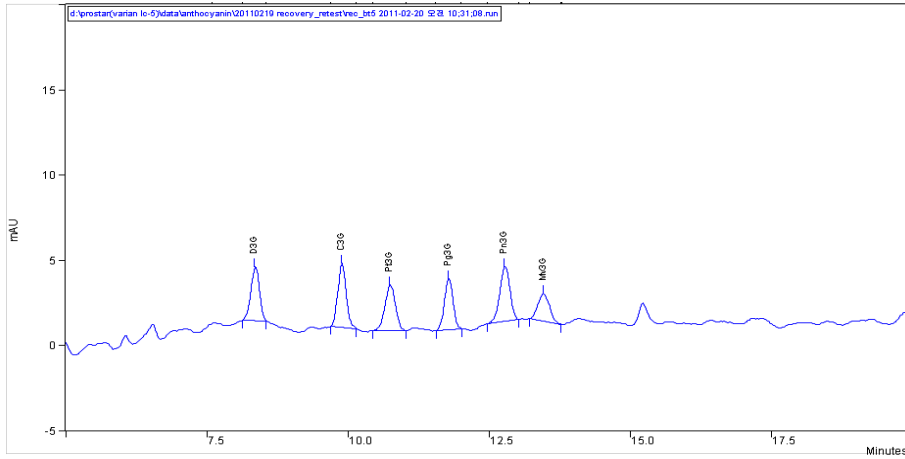


그림 77. 백태 회수율 크로마토그램(1 ppm)

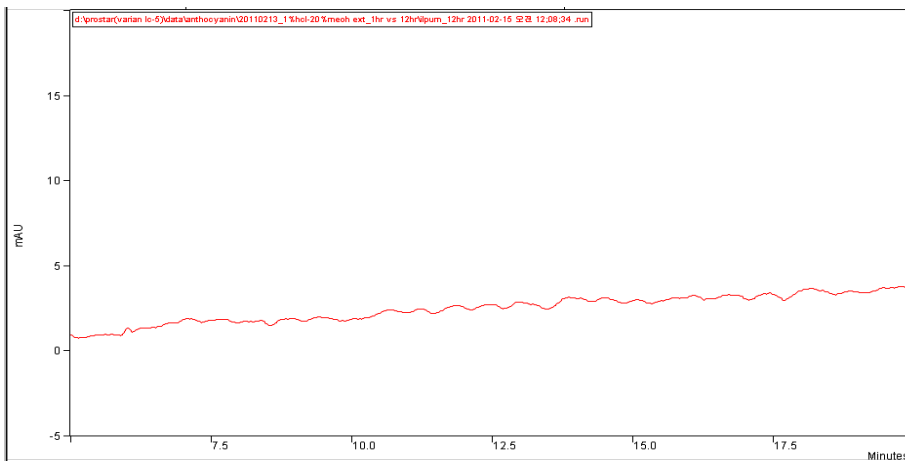


그림 78. 일품 control 크로마토그램

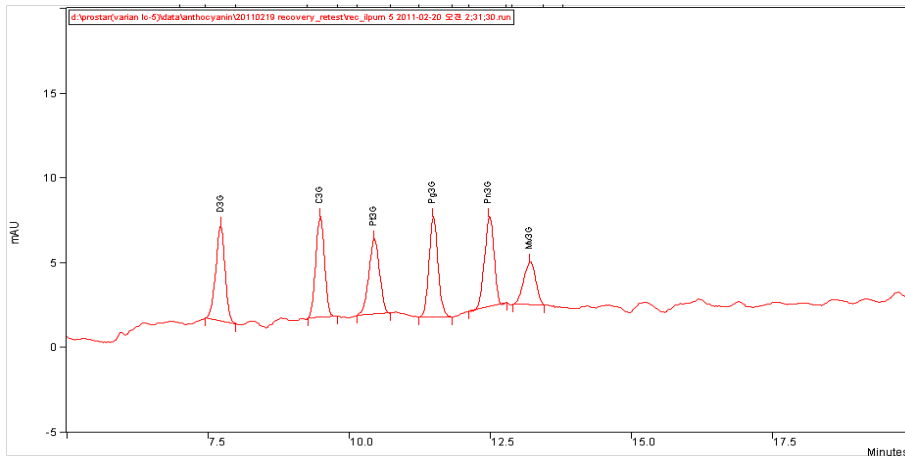


그림 79. 일품 회수율 크로마토그램(1 ppm)

(라) Anthocyanin 성분 분석 기술 개선

본 연구실에서는 anthocyanin 6종의 동시분석법 기술을 확립하였다. 그런데 시료 중 블랙 초크베리의 과육과 잎에서 과량으로 존재하는 unknown peak를 발견[그림 80]하였고, unknown peak가 어떤 성분인지를 밝히기 위한 연구가 진행되어 왔다. 베리류에 대한 문헌조사를 바탕으로 anthocyanin 계열 중 하나인 cyanidin-3-galactoside가 많이 존재하는 것을 확인하고, 기존의 6종 성분을 포함하여 동시 분석할 수 있는 기기분석 조건을 확립하였다. 그리고 확립된 방법을 시료에 적용하여 관련 생화학 성분 분석 서비스를 제공하였다.

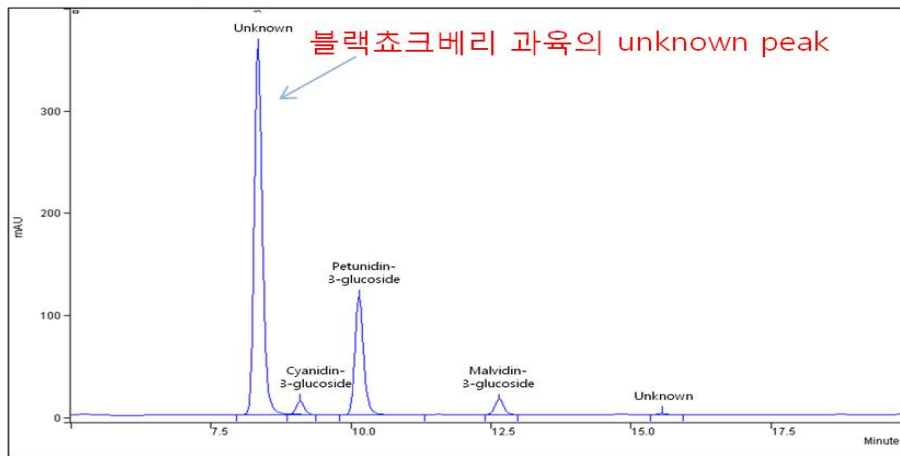
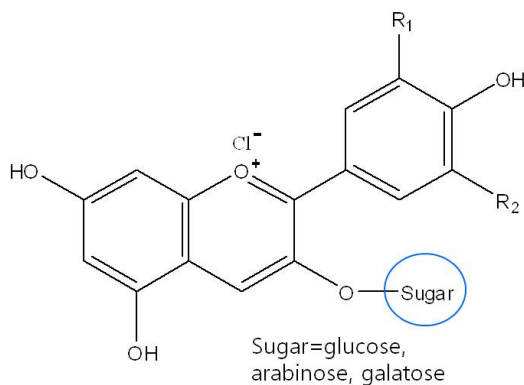


그림 80. 블랙초크베리 과육의 unknown peak

① Anthocyanin 7종의 구조 및 종류



Anthocyanin	R1	R2
Cyanidin-3-glucoside (C3G)	-OH	-H
Delphinidin-3-glucoside (D3G)	-OH	-OH
Pelargonidin-3-glucoside(Pg3G)	-H	-H
Malvidin-3-glucoside (Mv3G)	-OCH3	-OCH3
Peonidin-3-glucoside (Pn3G)	-OCH3	-H
Petunidin-3-glucoside (Pt3G)	-OH	-OCH3
Cyanidin-3-galactoside (C3Gal)	-OH	-H

② Anthocyanin 표준용액의 제조

Anthocyanin 분석에 사용된 표준용액(Polyphenol, Norway)은 Cyanidin-3-glucoside (C3G), Delphinidin-3-glucoside (D3G), Pelargonidin-3-glucoside (Pg3G), Malvidin-3-glucoside (Mv3G), Peonidin-3-glucoside (Pn3G), Petunidin-3-glucoside (Pt3G)으로 총 6종을 동시 분석했는데, Cyanidin-3-galactoside (C3Gal)를 새롭게 추가하여 총 7종의 표준용액을 제조하였다.

C3Gal을 제외한 anthocyanin 표준품 6종을 각각 5 mg을 1%HCl- 20%methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 그리고 C3Gal을 6종과 같은 방법으로 1000 ppm의 stock solution을 만들었다. Stock solution 각각을 1 ml 취하여 1%HCl- 20%methanol 10 ml로 정용 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

③ HPLC 기기분석 조건 확립 실험

기 개발된 anthocyanin 6종의 동시분석방법은 전체 분석시간이 46분이 소요된다. 그런데 실제 표준용액이 나타나는 시간은 15분 이내이다. 그래서 gradient elution 방법을 변경하여 전체 분석시간을 줄여보았다.

㉠ 분석방법 개선 I

기존 분석 조건은 표 18-19와 같다. 이동상과 컬럼, 유속 등 기본 조건은 동일하게 하고 gradient 조건만 변경해보았다. 실제 분석 시간은 15분이므로 10%에서 40%로 증가되는 유기 용매의 비율을 17분으로 줄이고 뒷부분은 clean up 단계로 설정해보았다[표 20]. Anthocyanin 표준용액 1 ppm을 분석해 본 결과 2011년 방법과 비슷한 retention time에서 나타나는 것을 확인하였다[그림 81, 82].

표 18. 기기 분석 조건

분석기기	Agilent HP1100 series
검출기 파장	UV 520nm
컬럼	Luna C18 column (250 X 4.6 mm, 5 micron)
오븐온도	40℃
이동상 A	Acetonitrile + 5% formic acid
이동상 B	DW + 5% formic acid
유속	0.7 ml/min
주입량	20 μ l

표 19. Gradient elution

Time	% A	% B
0	10	90
35	40	60
36	10	90
46	10	90

표 20. Gradient elution I

Time (min)	% A	% B
0	10	90
17	30	70
20	70	30
25	70	30
30	10	90
40	10	90

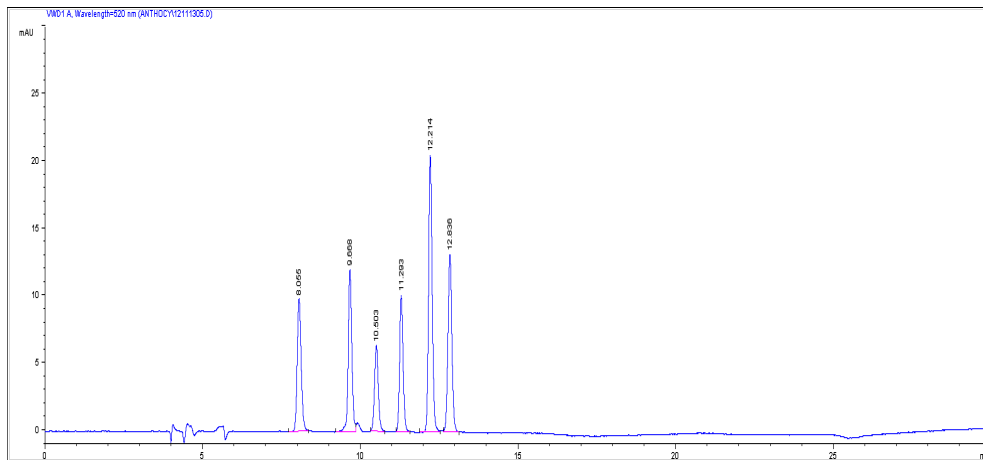


그림 81. Anthocyanin 표준용액 동시분석 결과 크로마토그램 (기존 방법)

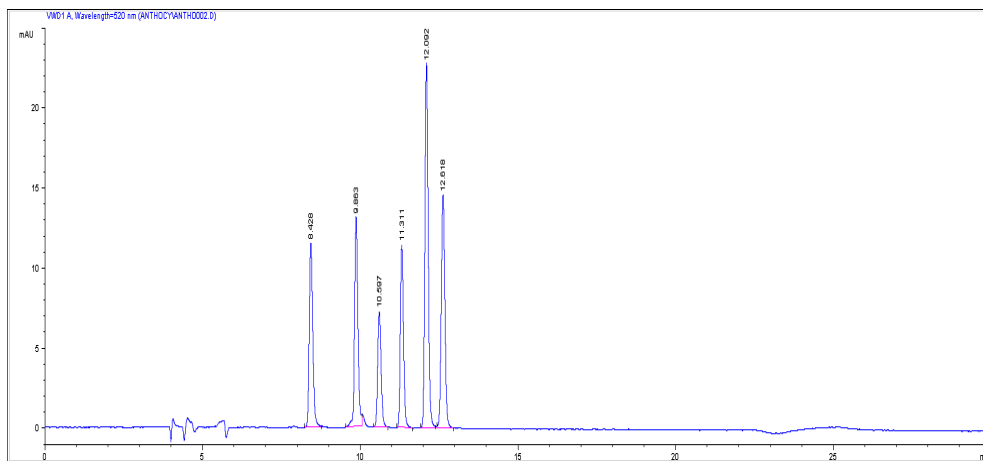


그림 82. Anthocyanin 표준용액 동시분석 결과 크로마토그램 (개선 방법 I)

㉞ 분석방법 개선 II

개선된 방법 I 결과를 보면 clean up과 안정화 시간을 줄여 분석시간을 30분으로 줄일 수 있었다[표 21]. 표준용액 1 ppm을 분석해 본 결과 anthocyanin 6종 성분 모두 13분 이내에 확인되었다[그림 83].

표 21. Gradient elution II

Time (min)	% A	% B
0	10	90
17	30	70
20	70	30
25	70	30
30	10	90
40	10	90

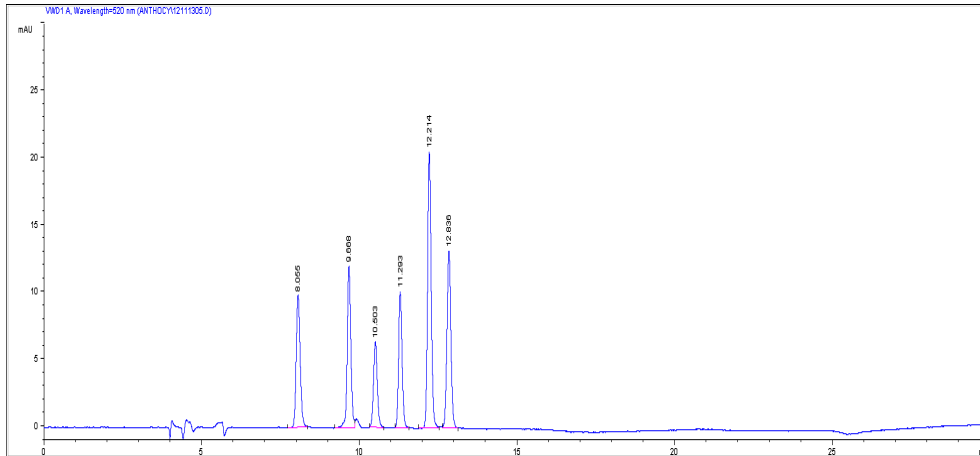


그림 83. Anthocyanin 표준용액 동시분석 결과 크로마토그램 (개선 방법 II)

㊤ Cyanidin-3-galactoside (C3gal) 분석

최종 확립된 개선 II 방법을 적용하여 C3Gal 성분을 분석해보았다. 표준용액 6종 5 ppm과 함께 비교하여 분석해 본 결과 C3Gal peak가 D3G와 C3G 사이에 나타나는 것을 확인하였다. D3G는 8.42분, C3Gal은 9.32분, C3G는 10.03분으로 농도가 증가해도 integration이 가능한 상태로 분리가 잘 되었다[그림 84, 85].

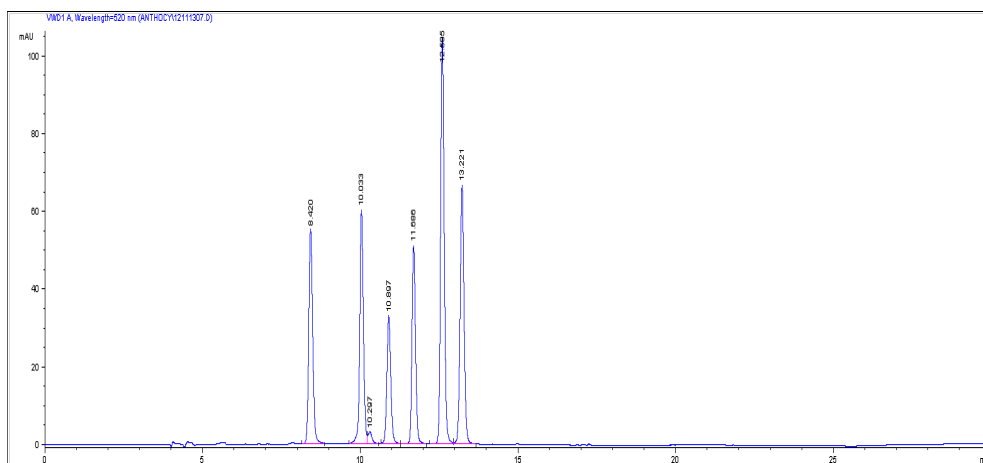


그림 84. Anthocyanin 표준용액(5 ppm) 6종 동시분석 결과 크로마토그램

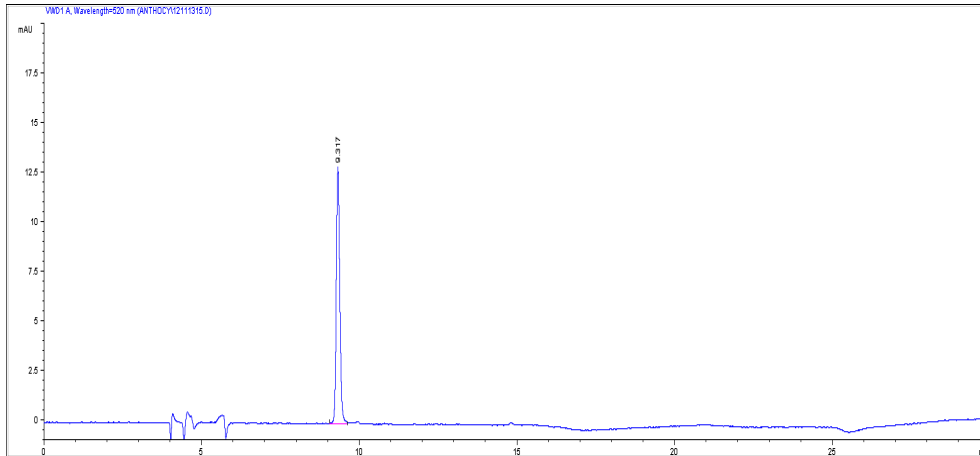


그림 85. Cyanidin-3-galactoside 표준용액(1 ppm) 분석 결과 크로마토그램

④. 작물 시료의 anthocyanin 7종 동시분석 결과

※ 개선 확립된 분석법을 이용하여 베리와 복숭아의 anthocyanin 7종 성분을 동시 분석하였다.

㉠ 시료의 분석 조건

- 분석기기: Shimadzu 10Avp HPLC
- 검출기: UV/VIS detector (Wavelength : 520 nm)
- 컬럼: Luna C18 (Phenomenex, 250 X 4.60mm, 5 micron)
- 컬럼 오븐 온도: 40 °C
- 이동상
 - Solvent A : DW + 5% formic acid
 - Solvent B : Acetonitrile + 5%formic acid
- 유속: 0.7 mL/min
- 주입량: 20 μ l

㉡ 시료의 추출 조건

동결 건조된 시료 0.1g에 1% HCl- 20% methanol 30 ml을 넣고 250 rpm에서 12시간 동안 추출하였다. 시료를 원심분리기로 2,500 rpm에서 10분 동안 원심분리 한 후 상층액을 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다. 위 과정은 3 번 반복하여 추출하였다.

㉢ 표준용액 검량선 작성

Anthocyanin 7종 표준용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 86-93].

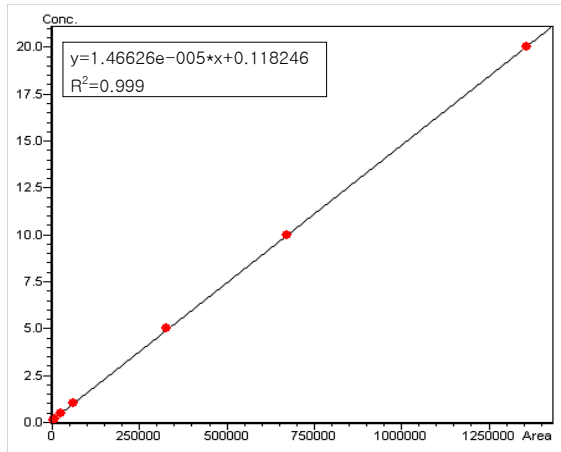


그림 86. Delphinidin-3-glucoside(D3G) 검량선

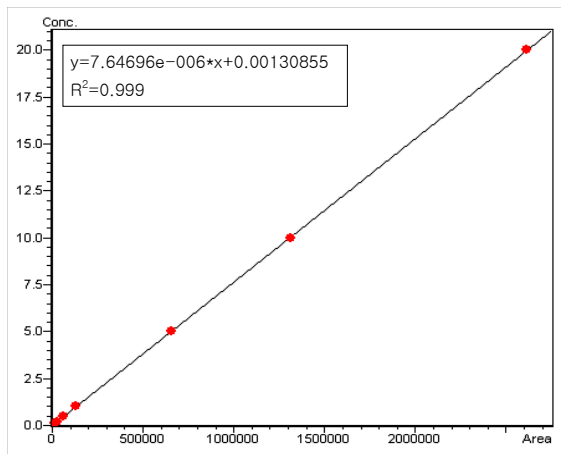


그림 87. Cyanidin-3-galactoside(C3Gal) 검량선

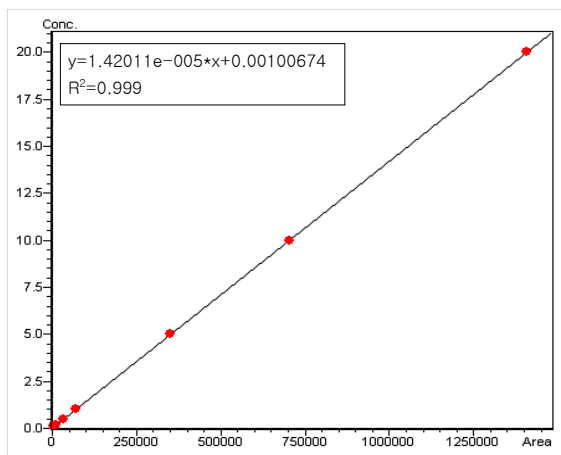


그림 88. Cyanidin-3-glucoside(C3G) 검량선

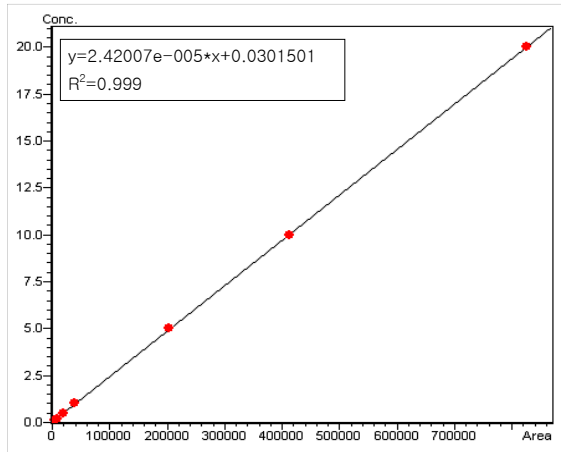


그림 89. Petunidin-3-glucoside(Pt3G) 검량선

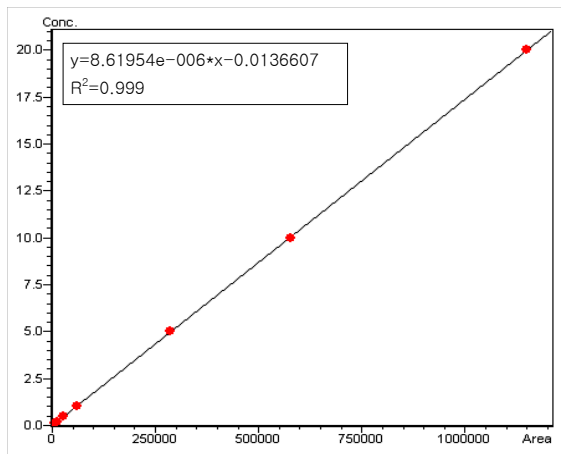


그림 90. Pelagonidin-3-glucoside(Pg3G) 검량선

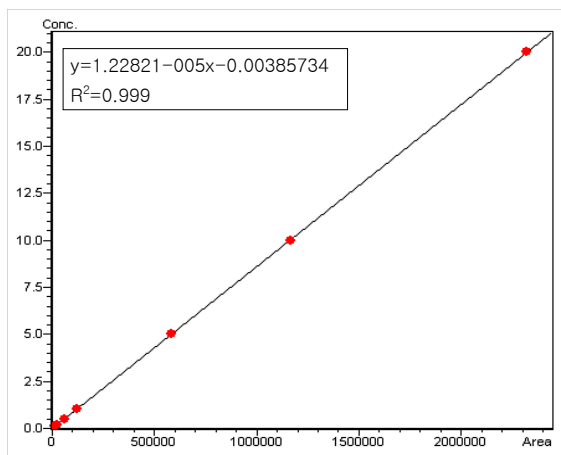


그림 91. Peonidin-3-glucoside(Pn3G) 검량선

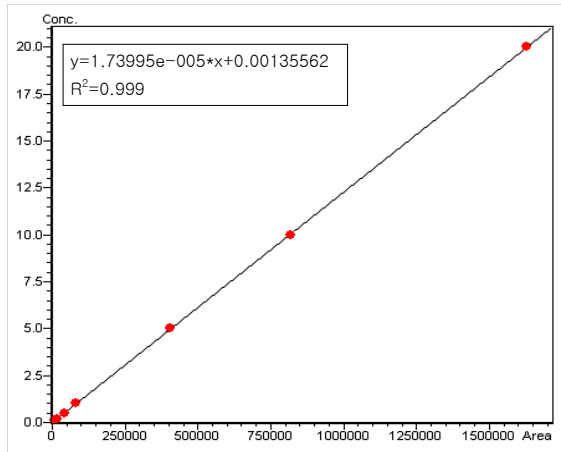


그림 92. Malvidin-3-glucoside(Mv3G) 검량선

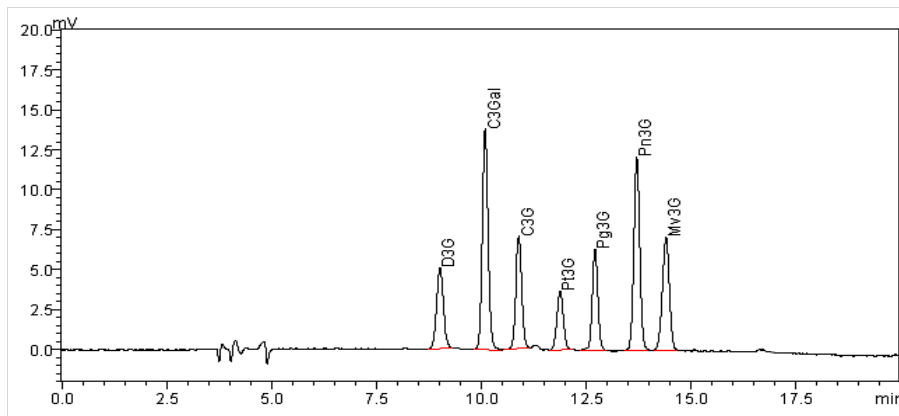


그림 93. Anthocyanin 표준용액(1ppm) 7종 동시분석 크로마토그램

㉠ 시료 분석 결과 크로마토그램

블랙초크베리, 퍼플초크베리, 준베리, 혈도복숭아 시료를 3반복 추출하여 anthocyanin 7종을 정량분석 하였다. 작물별로 총 anthocyanin 함량을 비교해보면 블랙초크베리>퍼플초크베리>준베리>혈도복숭아 순서로 높게 나타났다. 혈도복숭아의 경우 부위별로 나눠 함량을 비교했을 때, 과피보다는 과육에서 약 4배정도 높게 나타났다. 베리류에서는 주로 C3Gal 성분과 Pt3G 성분이 가장 많이 존재하였고, 복숭아는 C3G 성분이 가장 많이 함유된 것을 확인하였다. 그러나 D3G와 Mv3G는 모든 작물에서 전혀 검출되지 않았고, Pg3G는 혈도복숭아 과육부분에서, Pn3G는 준베리에서 일부 존재하고 그 이외에는 검출되지 않았다[표 22, 그림 94-98]. 블랙초크베리와 퍼플초크베리는 anthocyanin 7종에 속하지 않은 다른 anthocyanin류가 검출되었다.

표 22. 작물의 anthocyanin 함량 분석 결과

Sample	블랙초크베리	퍼플초크베리	준베리	혈도복숭아 (과육)	혈도복숭아 (과피)
D3G	ND*	ND	ND	ND	ND
C3Gal	8170.1 (2.6)**	6013.4 (4.1)	5320.5 (2.8)	ND	ND
C3G	545.5 (2.2)	341.9 (7.8)	17.8 (3.9)	1715.0 (12.5)	394.3 (1.4)
Pt3G	8546.3 (2.6)	7625.1 (3.6)	497.2 (3.8)	ND	ND
Pg3G	ND	ND	ND	<30	ND
Pn3G	ND	ND	<30	ND	ND
Mv3G	ND	ND	ND	ND	ND
총 함량	17,261.9	6,355.0	5,836.0	1715.0	394.3

* ND: Not detectable

** 변이계수(Coefficient of variation): 표준편차를 평균으로 나눈 수치

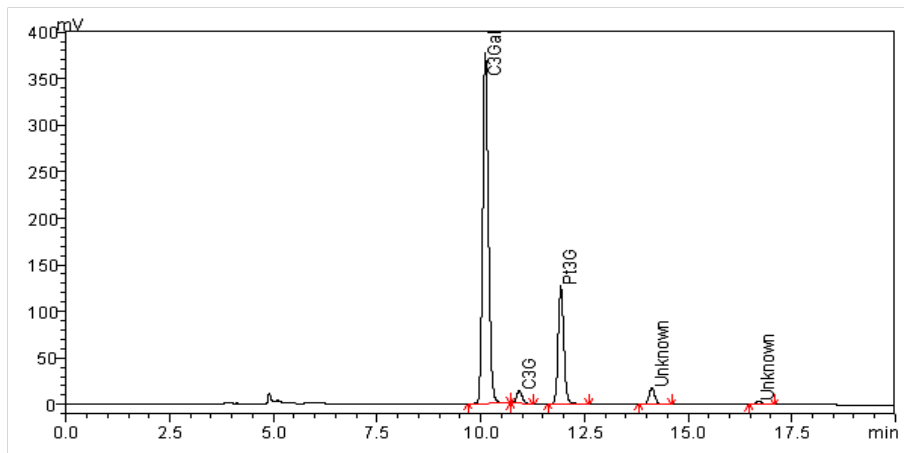


그림 94. 블랙초크베리 분석결과 크로마토그램

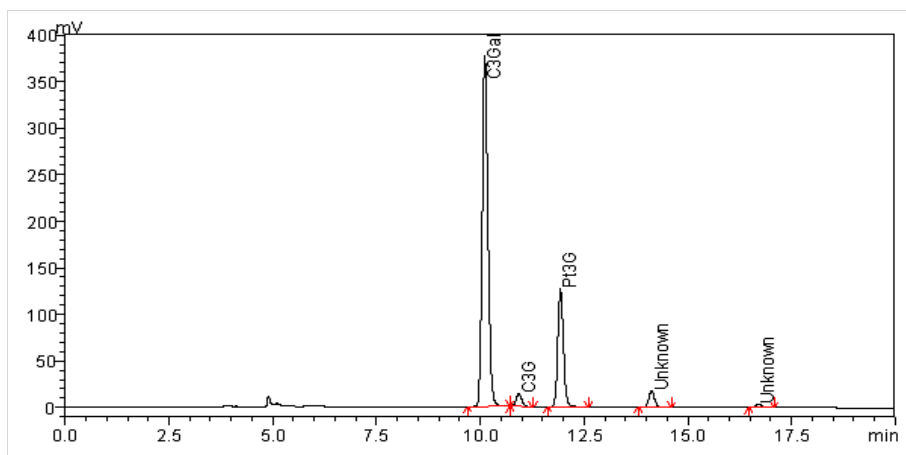


그림 95. 퍼플초크베리 분석결과 크로마토그램

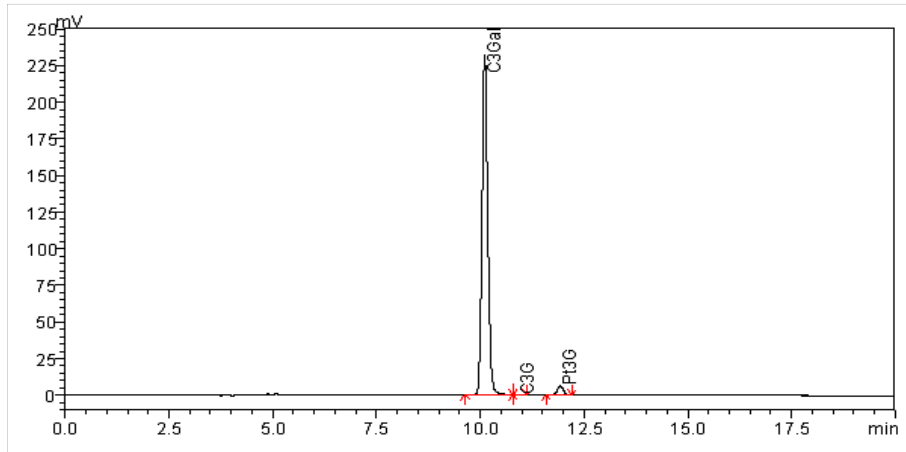


그림 96. 준베리 분석결과 크로마토그램

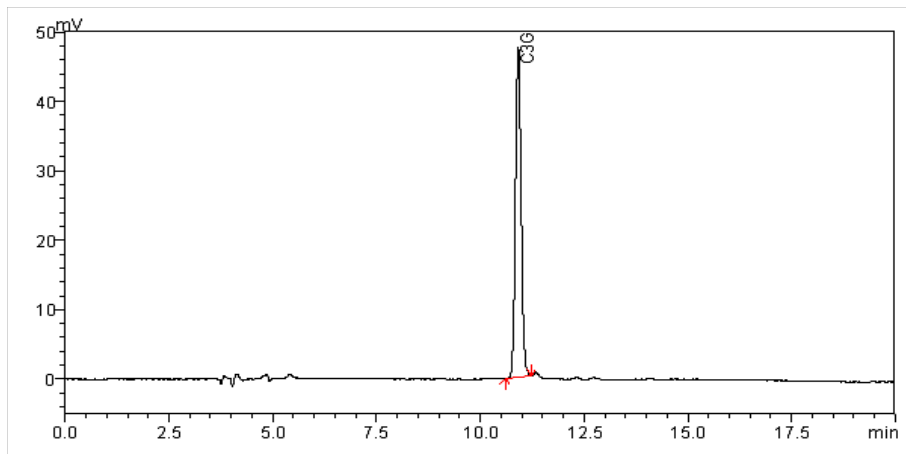


그림 97. 혈도복숭아(과육) 분석결과 크로마토그램

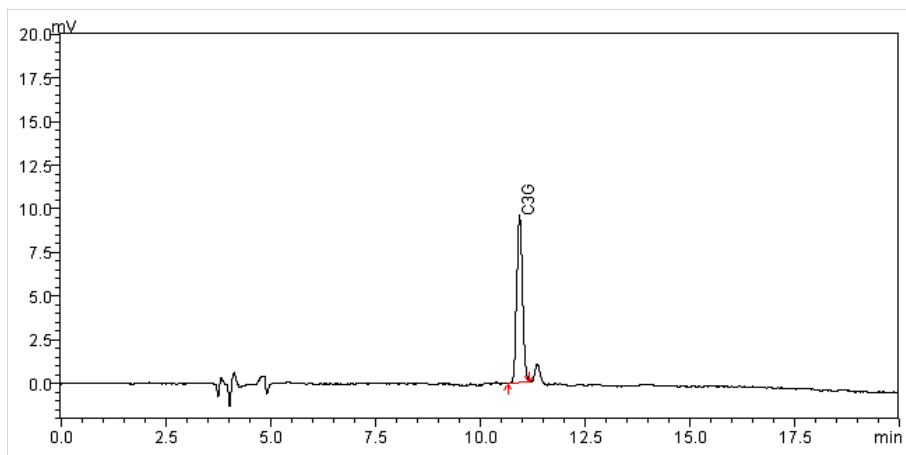


그림 98. 혈도복숭아(과피) 분석결과 크로마토그램

(마) LC-MS/MS를 이용한 anthocyanin 분석법 확립 예비실험

LC-MS/MS를 사용하여 6가지 anthocyanin을 분석할 수 있는 최적화 조건을 찾기 위한 실험을 진행하였다. 그 결과 peonidin-3-glucoside와 pelagonidin-3-glucoside는 분리가 확인되었으나 나머지 성분들은 겹쳐서 분리가 되지 않았다[그림 99-101]. 현재 anthocyanin 6종을 동시 분석하기 위한 최적 분리 조건을 연구 중이다.

① 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Varian LC-MS system
(equiped with varian 212-LC chromatography pump, Model 410 autosampler, prostar 325 UV-Vis detector and 500-MS mass spectrometer)
- Isonization and analyzer type : ESI(electro spray ionization) and Ion trap
- Column : Thermo C18 column (150 × 2.1 mm, 3 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid
- Flow rate : 0.1ml/min
- Injection volume : 2 μ l
- Analytical conditions
 - Drying temperature : 350°C
 - Needle voltage : 5 kV
 - Capillary voltage : 80 V
 - Drying gas pressure (nitrogen) : 30 psi
 - Nebulizer gas pressure (nitrogen) : 40 psi

② Anthocyanin (6종) 표준용액 분석 결과 크로마토그램 및 MS spectrum

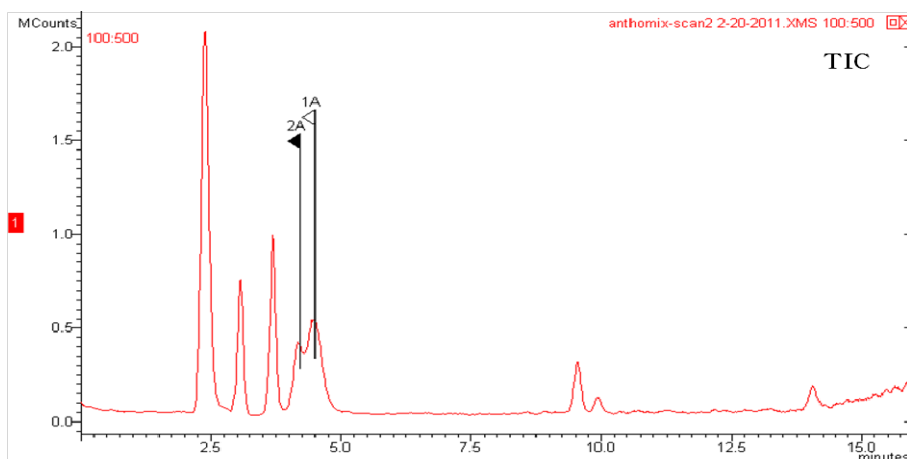


그림 99. Anthocyanin 표준용액 분석 크로마토그램 (TIC)

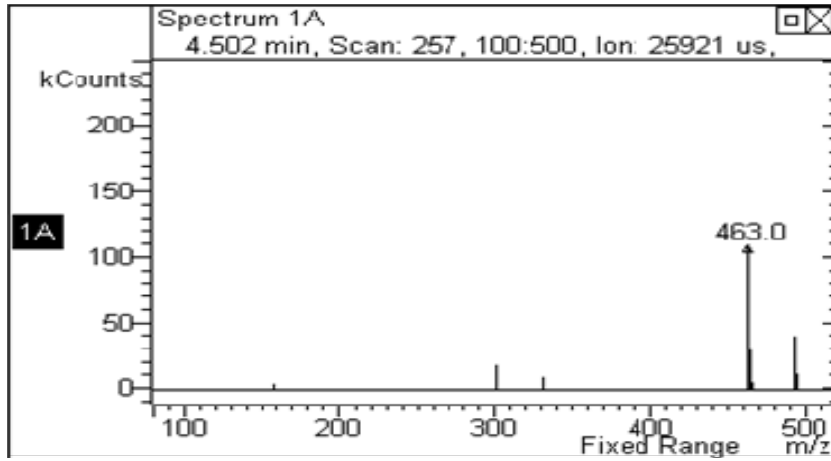


그림 100. Peonidin-3-glucoside(Pn3G) MS spectrum

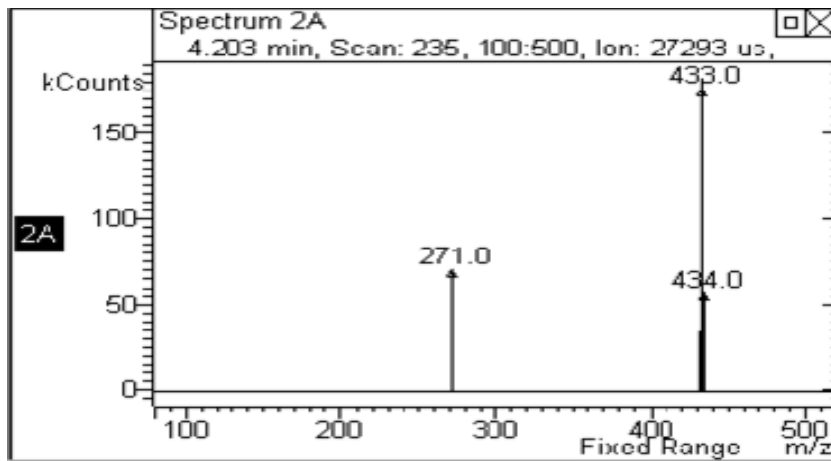


그림 101. Pelagonidin-3-glucoside(Pn3G) MS spectrum

(3) 당초 연구목표 이외의 isoflavone, anthocyanin 동시분석법 확립을 위한 예비 실험

※ Isoflavone 및 anthocyanin의 다성분 동시 분석법 확립이 완료되었고, 이러한 분석법 개발 과정에서 당초 목표 이외의 isoflavone과 anthocyanin의 동시분석법을 추가 개발 하고자 HPLC 및 LC-MS/MS로 예비실험을 수행하고 가능성을 확보하였다.

※ Isoflavone과 anthocyanin을 동시에 분석하기 위하여 isoflavone을 anthocyanin 조건에 맞춰서 분석해 본 결과 기존의 분석 조건 중 파장을 520 nm로 할 경우 isoflavone은 검출되지 않지만, 270 nm에서는 anthocyanin과 isoflavone 성분이 모두 나타났다. 그러나 머무름 시간을 비교해 보았을 때, anthocyanin의 malvidin-3-glucoside(Mv3G)와 isoflavone의 daidzin이 비슷한 시간에 나타나는 것을 확인하였다[그림 102-104]. LC-MS/MS를 이용할 경우 peak가 겹쳐도 분석이 가능하기 때문에 anthocyanin과 isoflavone 성분을 모두 동시 분석 할 수 있는 MS/MS 분석 조건을 확립하기 위한 실험을 진행할 계획이다.

(가) 시료의 추출 및 분석

분쇄한 콩 0.1 g에 1%HCl-20%methanol 30 ml를 가하고 250 rpm에서 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 µm PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 µl씩 주입하여 HPLC로 분석하였다[그림 105].

(나) 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Varian ProStar HPLC (USA)
- Detector : Photodiodearray detector (Wavelength; 270nm)
- Column : Shiseido C18 column (250 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 5% formic acid
 - Solvent B : DW + 5% formic acid
 - Gradient program

Time(min)	%A	%B
0	10	90
35	40	60
36	10	90
46	10	90

- Flow rate : 0.7 ml/min
- Injection volume : 20 µl

(다) 표준용액 분석 결과 크로마토그램

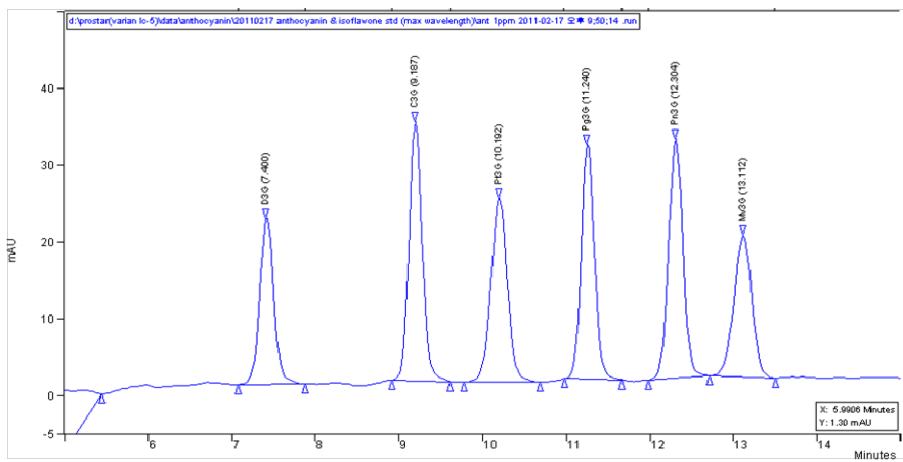


그림 102. Anthocyanin 표준용액(1 ppm) 분석 크로마토그램

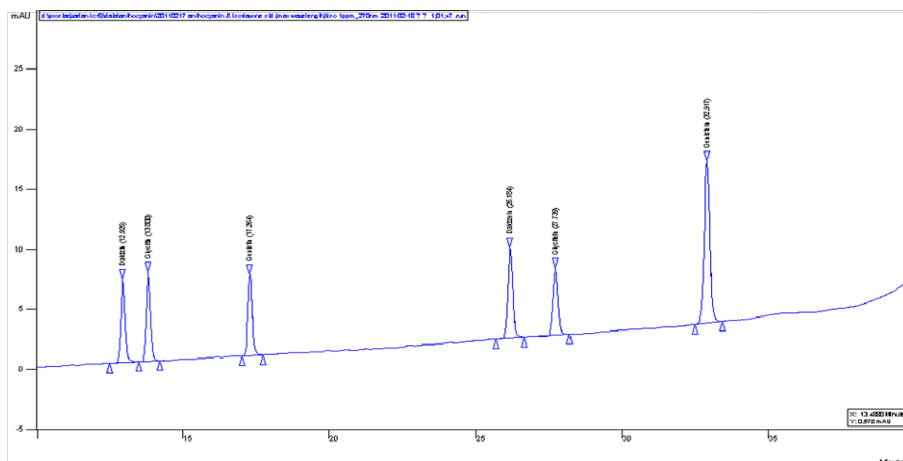


그림 103. Isoflavone 표준용액(1 ppm) 분석 크로마토그램

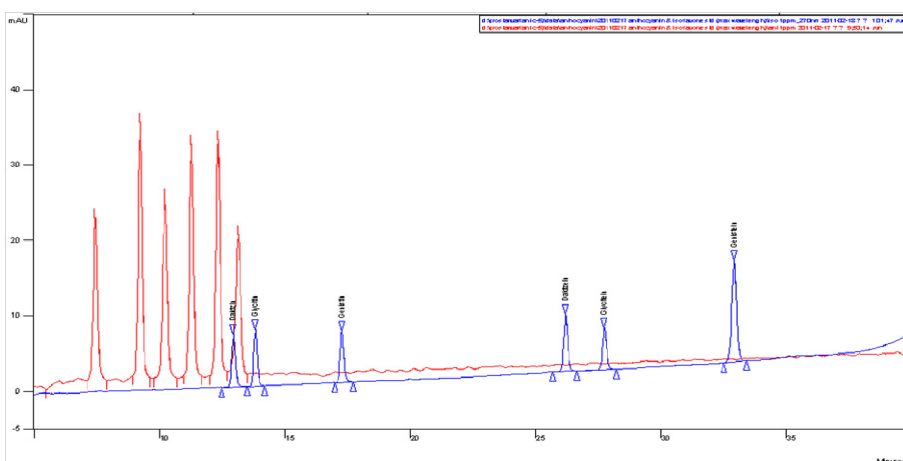


그림 104. Isoflavone & anthocyanin 표준용액(1 ppm) 분석 크로마토그램

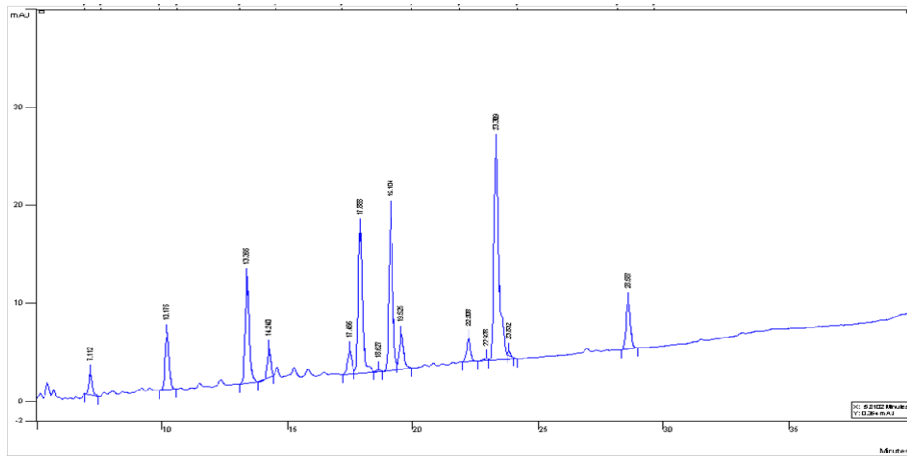


그림 105. 백태 시료 분석 크로마토그램

다. 배추와 고추 등의 엽채류 채소의 기능성 성분 (glucosinolates, 당류) 분석법 확립

(1) 고추 및 과일류에 함유된 당 성분의 분석법 확립

(가) 당류(Sugars) 분석법 확립

당류에는 단당류, 이당류, 다당류, 당 알코올로 분류되는데 단당류에는 glucose, fructose, galactose가 있다[그림 106]. Glucose는 포도에 다량 함유되어 있고, 혈당으로 혈액에도 존재한다. 뇌와 신경세포의 유일한 에너지원이다. Fructose는 과일과 벌꿀에 함유되어 있고 당류 중 단맛이 가장 강하다. Galactose는 lactose의 구성성분으로 존재하며 단당류 중 단맛이 가장 약하다.

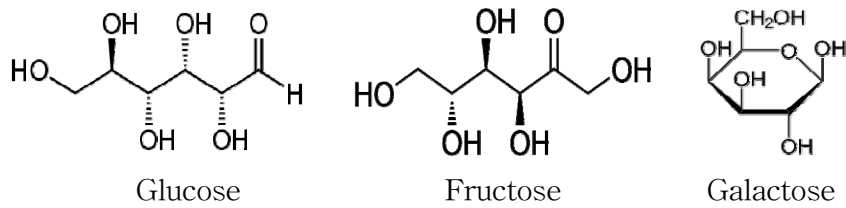


그림 106. 단당류 구조

이당류는 단당류 두 개가 결합한 당으로 maltose, sucrose, lactose가 있다[그림 107]. Maltose는 glucose와 glucose가 결합된 형태로 발아되는 곡류에 함유되어 있다. Sucrose는 glucose와 fructose가 결합된 형태로 사탕수수, 과일에 다량 함유되어 있다. Lactose는 glucose와 galactose가 결합된 형태로 우유, 유제품, 유즙에 함유되어 있다.

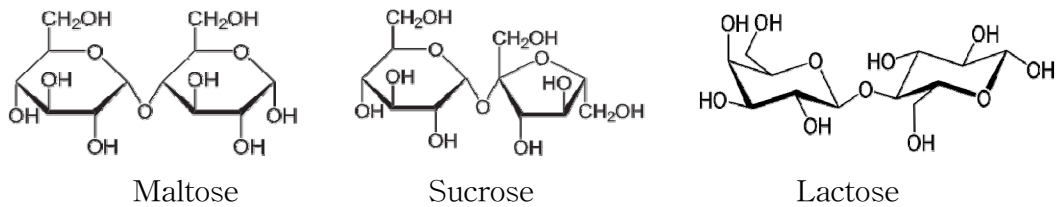


그림 107. 이당류 구조

다당류는 단당류 두 개 이상이 결합된 당으로 주로 녹말, 글리코젠, 식이섬유소가 다당류에 속한다[그림 108]. Raffinose는 galactose, fructose, glucose로 되는 비환원성의 삼당류로 식물계에서는 sucrose 다음으로 많이 분포하는 올리고당류이다. 특히 사탕무의 당밀나 목화열매의 껍데기에 많이 함유되어 있다.

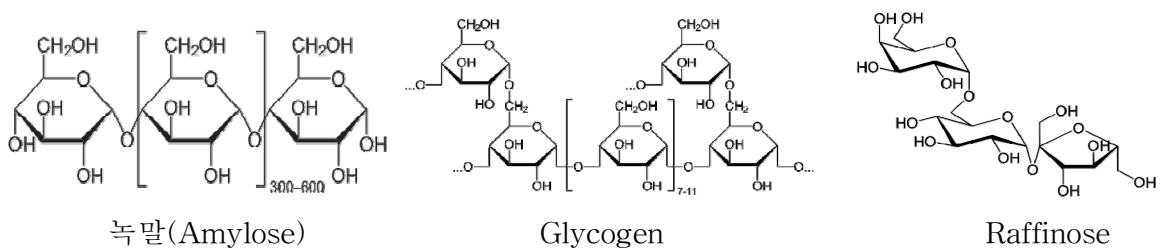


그림 108. 다당류 구조

일반적으로 당은 체내에서 에너지를 공급한다. 혈당을 유지하고 두뇌형성인자로 이용되며 장내의 유산균과 비피더스균의 생육을 촉진하는 에너지 공급원으로 사용된다. 당은 단맛을 내므로 식품의 조리 및 향미에 영향을 미친다.

(나) 당류(Sugars) 분석법 확립

※ 본 연구에서는 과일에 가장 많이 존재하는 glucose, fructose, sucrose와 곡류에 함유된 maltose, 식물계에서 sucrose 다음으로 많이 분포하는 올리고당류인 raffinose를 포함하는 당 5종의 동시분석법을 개발하였다.

※ 고추 및 과일류(사과, 포도, 참외, 수박, 멜론)에 함유된 당 성분을 분석하기 위해 Kubola(2011)의 추출방법을 사용하였고, HPLC-RID/ELSD로 분석조건을 확립하였다.

① 당(Sugar) 분석용 표준용액의 제조

㉠ 단성분 표준용액 제조

일반당 표준품 5종(Glucose, fructose, sucrose, maltose, raffinose) 각 10 mg을 각각 10 ml volumetric flask에 넣고 증류수 10 ml에 녹여 1,000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Stock solution 5 ml을 취하여 증류수 5 ml에 녹여 500 ppm 농도의 working solution을 제조하였다. 이 표준용액을 단계적으로 희석하여 500, 200, 100, 50, 25, 20 ppm 용액을 만들었다.

㉡ 다성분 표준용액 제조

또한, 당 5종의 단성분 표준용액을 동일한 비율로 혼합하여 1,000 ppm 농도의 다성분 표준용액 stock solution을 만들고 위의 과정과 동일하게 희석용액(각 당의 농도; 500, 200, 100, 50, 25, 20 ppm)을 만들었다.

② 당(Sugar) 분석용 HPLC 검출기 선택 및 다성분(5종) 동시분석 기기조건 확립

㉠ HPLC 검출기 ELSD의 선택비교

당은 자외선 영역에서 흡광을 갖지 않기 때문에 HPLC-UVD(Ultra Violet Detector)를 사용하지 못하고 주로 RID(Refractive Index Detector)와 ELSD(Evaporative Light Scattering Detector)를 사용하여 분석한다. 그 중 RID는 이동상의 굴절률과 시료가 지나갈 때의 굴절률 변화를 비교하는 원리로 당 분석에 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 장치의 안정화 시간이 오래 걸리고 감도가 낮으며 기울기 용매법을 사용할 수 없는 단점이 있다. 반면, ELSD는 이동상을 증발시킨 후 분석 대상의 입자들이 빛을 산란시키는 정도를 측정하는 원리로 분석 물질이 이동상보다 끓는점이 높기만 하면 분석이 가능하다. ELSD는 RID에 비해 장치가 빨리 안정화되고, 기울기 용매기법을 적용할 수 있고 실온변화의 영향을 받지 않는다. 특히 당류 분석에 있어서 RID의 5-10배 높은 감도를 나타낸다.

㉔ 기기분석 조건 확립

■ 5종의 당 표준물질(100ppm)의 HPLC-RID 분석

- 분석기기: Shimadzu 10Avp HPLC
- 검출기: RID-10A
- 컬럼: Asahipak NH2P-40E Shodex (4.6 x 250mm, 5 μ m)
- 온도
 - Column oven temperature: 40 °C
 - RID cell temperature: 40 °C
- 이동상
 - Solvent A: Water
 - Solvent B: Acetonitrile
- 유속: 1.0 mL/min
- 주입량: 20 μ l

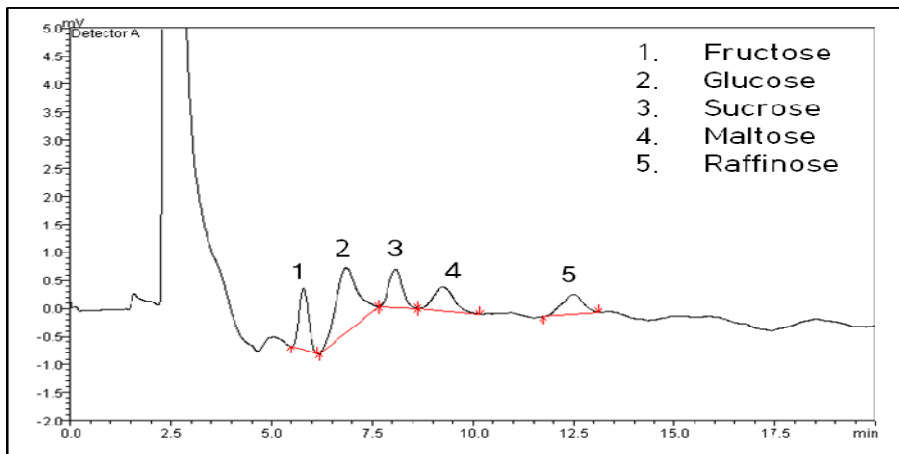


그림 109. 5종 당 표준용액(100ppm) RID 분석 크로마토그램

■ 5종의 당 표준물질(100ppm)의 HPLC-ELSD 분석

- 분석기기: Agilent 1100 series HPLC
- 검출기: ELSD
- 컬럼: Asahipak NH2P-40E Shodex (4.6 x 250mm, 5 μ m)
- 컬럼 오븐 온도: 35 °C
- 이동상
 - Solvent A: Water
 - Solvent B: Acetonitrile
 - Gradient program

Time(min)	% DW	% ACN
0	5	95
2	5	95
7	35	65
20	35	65
23	5	95
28	5	95

- 유속: 1.0 mL/min
- 주입량: 20 μ l
- ELSD 조건
 - Tube temperature: 85 $^{\circ}$ C
 - Nitrogen gas flow: 2 L/min

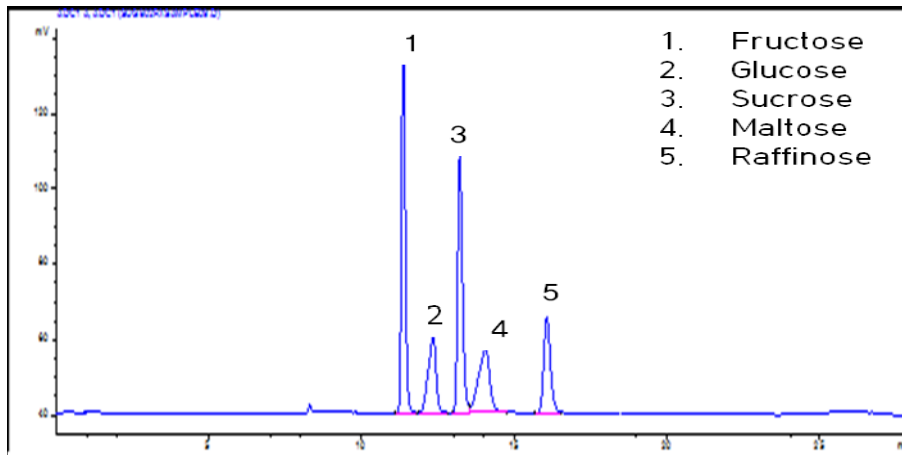


그림 110. 5종 당 표준용액(100ppm) ELSD 분석 크로마토그램

㉔ RID 및 ELSD 분석 결과

RID와 ELSD로 5종의 당 표준물질(100ppm)을 분석해서 크로마토그램을 비교한 결과 같은 농도에서 ELSD가 RID보다 훨씬 높은 감도를 보일 뿐 아니라 peak의 모양도 월등하여 [그림 105-106]. ELSD를 당 분석용 검출기로 선택하였고, 기기조건도 ‘HPLC-ELSD 분석법’으로 확립하였다[그림 111-115].

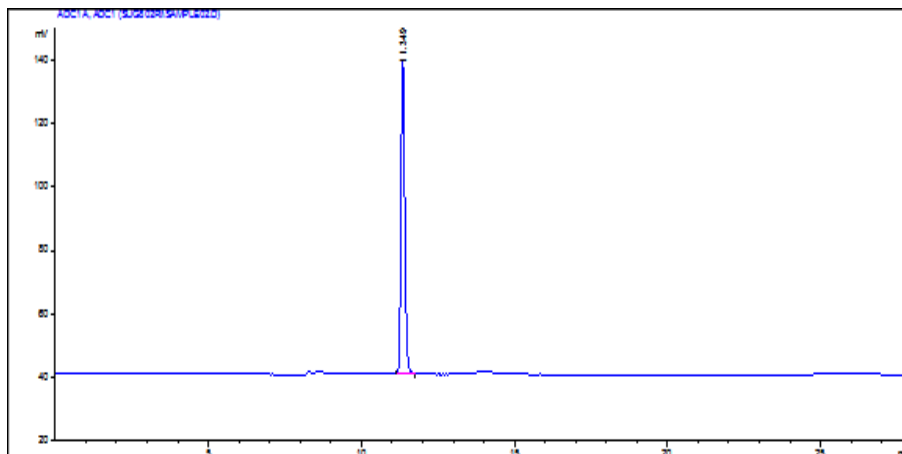


그림 111. Fructose 표준용액(100ppm) 분석 크로마토그램

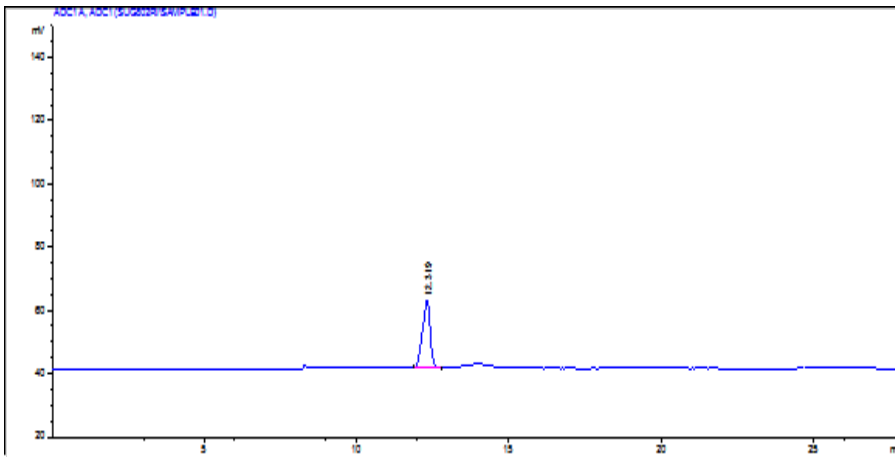


그림 112. Glucose 표준용액(100ppm) 분석 크로마토그램

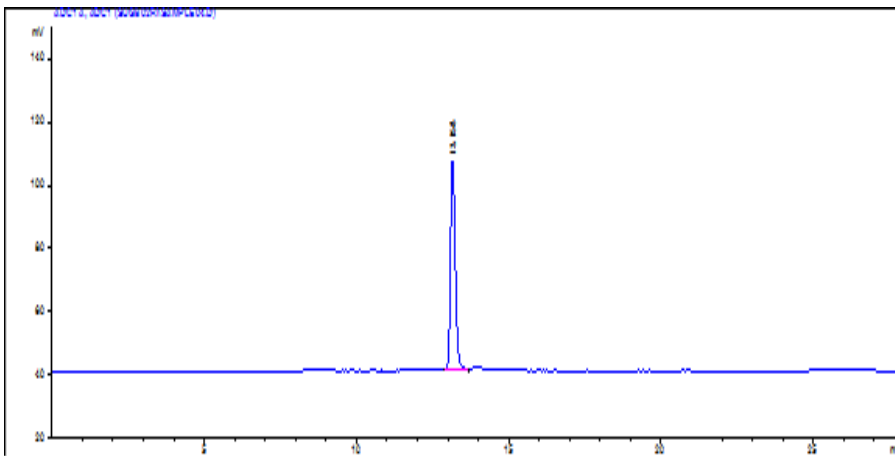


그림 113. Sucrose 표준용액(100ppm) 분석 크로마토그램

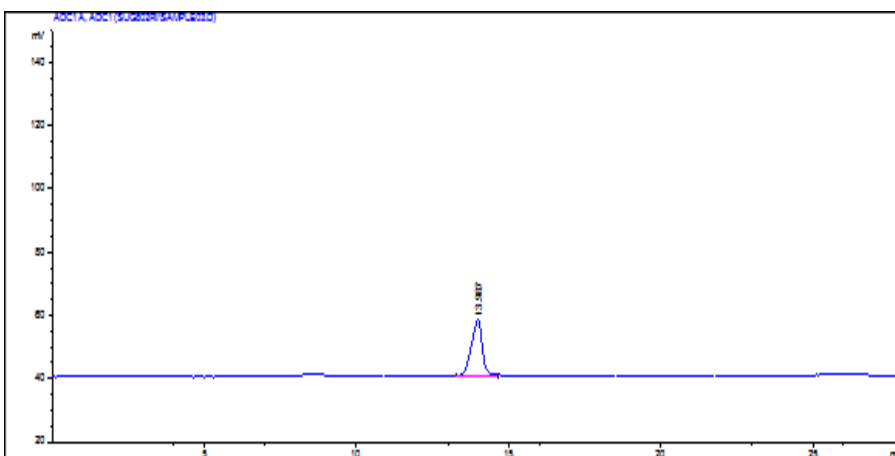


그림 114. Maltose 표준용액(100ppm) 분석 크로마토그램

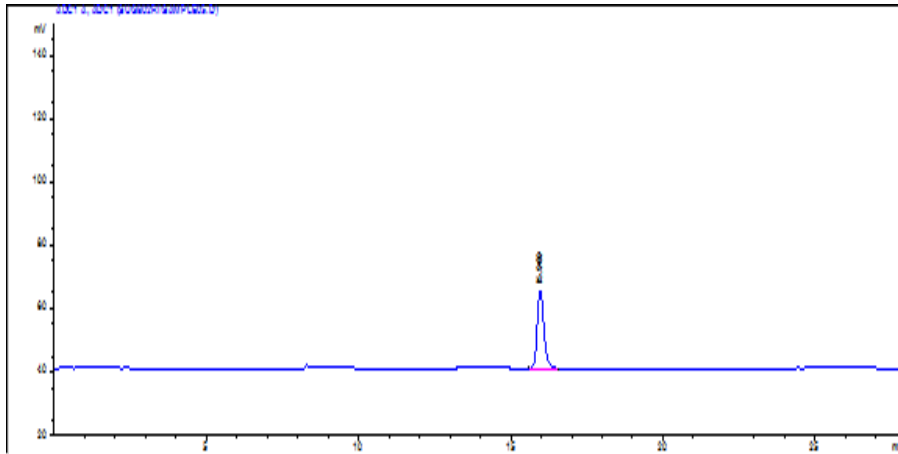


그림 115. Raffinose 표준용액(100ppm) 분석 크로마토그램

③ 시료 추출 방법의 확립

※ 다양한 작물의 당 함량을 알아보기 위하여 고추 및 수박, 참외, 멜론, 사과, 포도를 구입하여 각각 믹서기에 갈아 냉동보관 후 사용하였다.

※ 당 함량 분석을 위한 추출 과정은 J. Kubola et al.(2011) 방법을 이용하였다.

시료 1g에 20 ml DW를 가하고 80 °C water bath에서 30분 동안 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 후 0.45 µm nylon syringe filter에 여과하였다. 각 시료는 5반복 추출하여 HPLC-ELSD로 분석하였다.

(다) 분석법 검증

※ 위 분석 방법의 유효성을 확인하기 위해 검출한계와 정량한계, 재현성, 직선성 실험을 진행하였다.

① 분석 기기의 검출한계, 정량한계

검출한계(Limit of Detection, LOD) 및 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는 분석기기의 감도를 검증할 수 있는데, 다양한 농도의 표준용액을 분석하여 S/N ratio(signal과 noise의 비율)을 구하고, 검출한계는 S/N > 3~5배, 정량한계는 S/N > 10배(LOD의 3~5배 이상)로 하였다[표 22].

표 22. 당 5종의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

Sugars	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	Raffinose
LOD(ng)	50	100	100	200	100
LOQ(ng)	200	400	400	1000	400

② 분석의 재현성

분석의 재현성 실험은 일정한 양의 표준품을 7번 이상 반복 주입 분석하여 머무름 시간

(t_R), peak의 면적(Area)의 오차를 조사하는데, 전체적으로 분석기기의 안정성을 알아보기 위해 수행한다. 본 연구에서 설정한 정량한계(LOQ) 및 정량한계의 열배의 양(10LOQ) 수준으로 진행을 연속으로 7번 분석한 결과, t_R , area의 반복 분석간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다[표 23].

표 23. 당류(5종)의 재현성 실험 결과

Sugars		Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	Raffinose	
LOQ N=7	t_R	Average	11.30	12.32	13.32	14.13	16.21
		C.V	0.02	0.04	0.02	0.09	0.09
	Area	Average	45.66	50.71	89.89	74.56	66.06
		C.V	3.78	2.17	1.09	4.58	2.18
10LOQ N=7	t_R	Average	11.31	12.31	13.33	14.12	16.23
		C.V	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04
	Area	Average	1038.29	1124.42	2457.38	1830.61	1458.32
		C.V	1.25	2.87	3.73	2.39	3.21

③ 검량선의 직선성

㉞ 표준용액 조제

5종 당 성분의 500, 200, 100, 50, 25, 20 ppm 다성분 표준용액을 각각의 농도를 20 μ l 씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로[그림 116] 표준 검량선을 작성하였다.

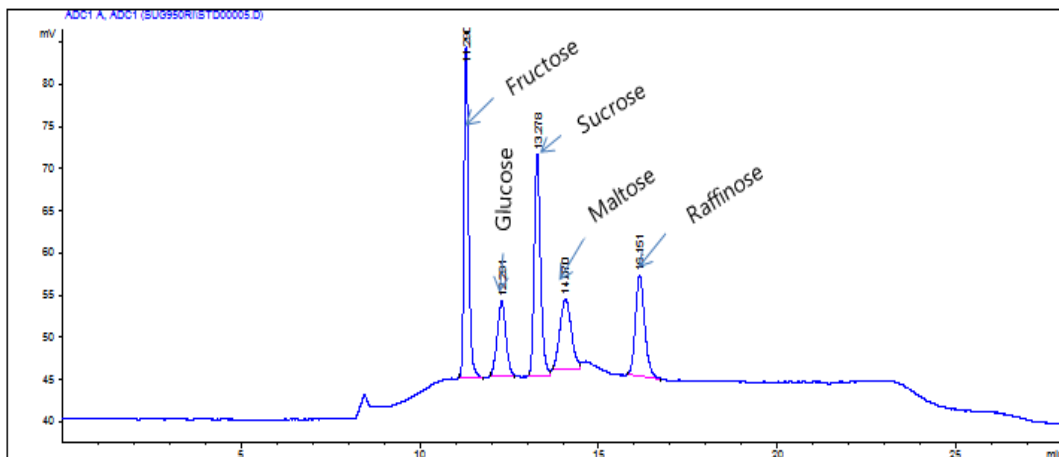


그림 116. 당 5종 표준용액(50ppm) 분석 크로마토그램

㉟ 표준용액(20~500ppm) 검량선의 직선성

당 5종 표준용액(20~500ppm)을 분석하여 얻은 검량선은 $R^2=0.99$ 이상으로 직선성이 우수함을 확인하였다[그림 117-121, 표 24].

표 24. 당 5종 표준용액의 검량선 및 직선성

Sugar	Calibration curve	R ²
Fructose	$y=21.24x-552.54$	0.992
Glucose	$y=6.11x-65.30$	0.991
Sucrose	$y=12.09x-102.95$	0.996
Maltose	$y=8.63x-163.54$	0.996
Raffinose	$y=10.19x-192.71$	0.997

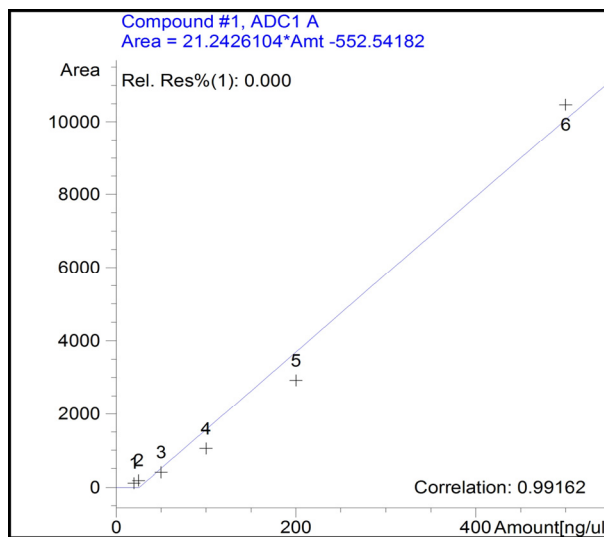


그림 117. Fructose의 검량선

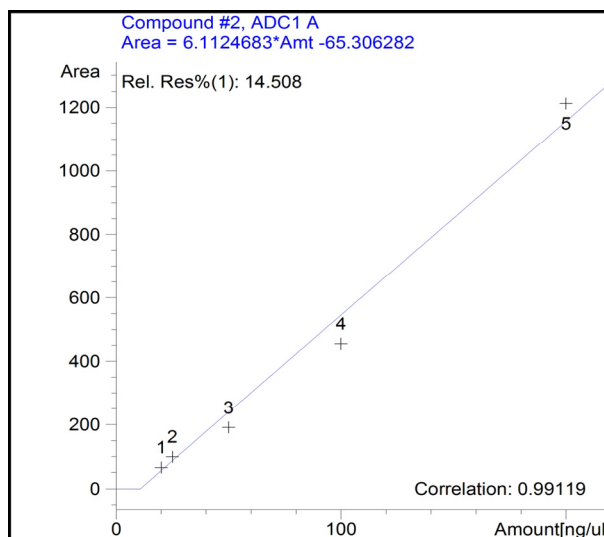


그림 118. Glucose의 검량선

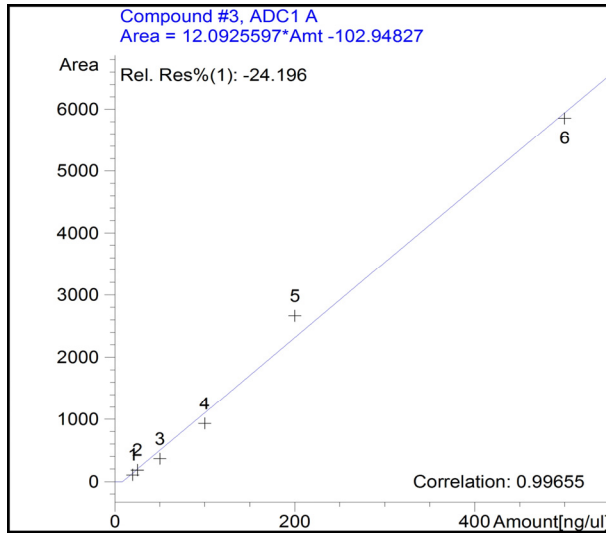


그림 119. Sucrose의 검량선

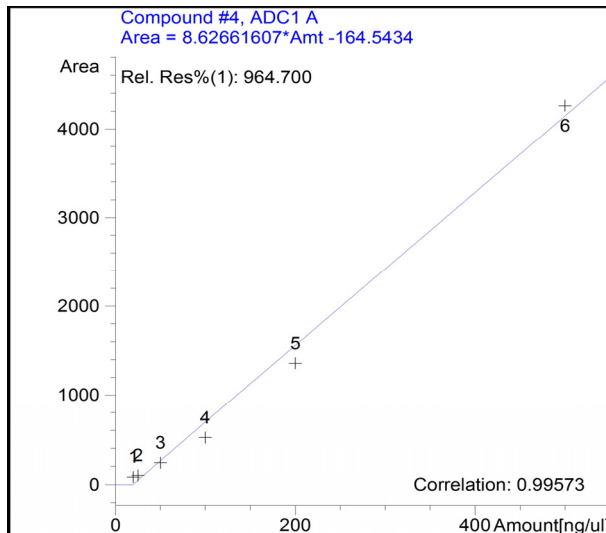


그림 120. Maltose의 검량선

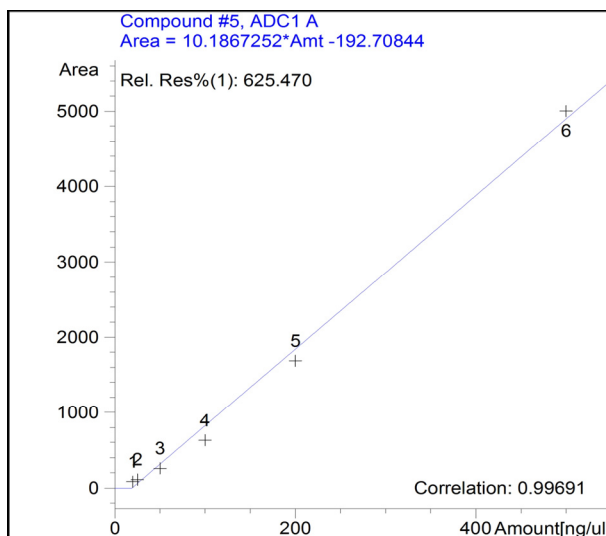


그림 121. Raffinose의 검량선

④ 작물 시료의 당 분석 및 결과

※ HPLC-ELSD 및 확립/검증된 분석법을 이용하여 고추 및 과일류(수박, 참외, 멜론, 사과, 포도)의 당 5종을 분석하였다.

㉠ 기기 분석 조건

- 분석기기: Agilent 1100 series HPLC
- 검출기: ELSD
- 컬럼: Asahipak NH2P-40E Shodex (4.6 x 250mm, 5 μ m)
- 컬럼 오븐 온도: 35 °C
- 이동상
 - Solvent A: Water
 - Solvent B: Acetonitrile
 - Gradient program

Time (min)	% DW	% ACN
2	5	95
7	35	65
20	35	65
23	5	95
28	5	95

- 유속: 1.0 mL/min
- 주입량: 20 μ l
- ELSD 조건
 - Tube temperature: 85 °C
 - Nitrogen Gas flow: 2 L/min

㉡ 시료 분석 결과

고추 및 과일류의 당 5종을 분석한 결과 참외의 총 당 함량이 100g 당 12.2g으로 가장 높게 나타났다[표 25]. 총 당 함량은 참외>포도>멜론>수박>사과>고추 순으로 높았다. 각 당 성분별로 보면 fructose는 사과>포도>수박>멜론>참외>고추 순이었고, glucose는 멜론>포도>수박>사과>참외>고추 순이었다. Sucrose의 경우 참외>수박>사과 순서로 함량이 높았고, 고추와 멜론, 포도에서는 검출되지 않았다. 그리고 maltose와 raffinose는 어느 작물에서도 관찰되지 않았다[그림 122-127].

표 25. 시료별 당 함량 결과

당 함량 (g/100g)						
	고추	수박	참외	사과	멜론	포도
Fructose	0.9	4.5	1.7	5.9	1.7	5.3
Glucose	1	2.5	8.6	2.7	8.4	6.6
Sucrose	ND	2.6	1.9	0.8	ND	ND
Maltose	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Raffinose	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total Sugar	1.9	9.6	12.2	9.4	10.1	11.9

ND = Not detectable

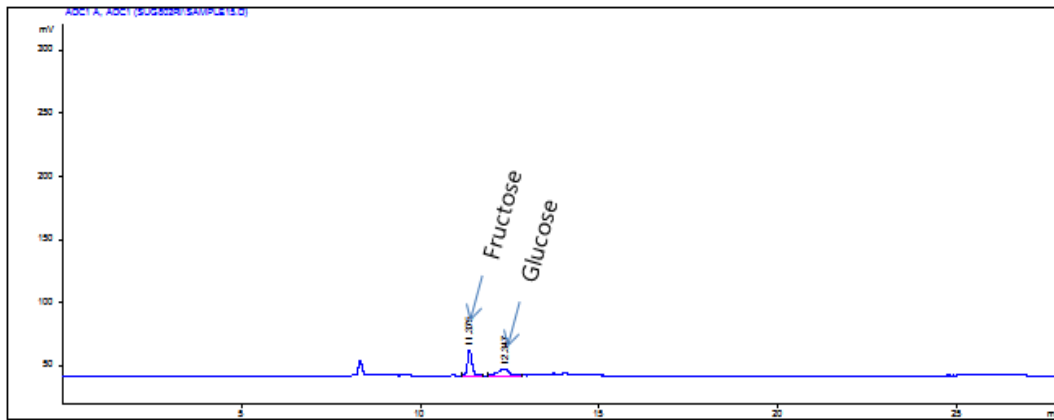


그림 122. 고추 시료 분석 결과 크로마토그램

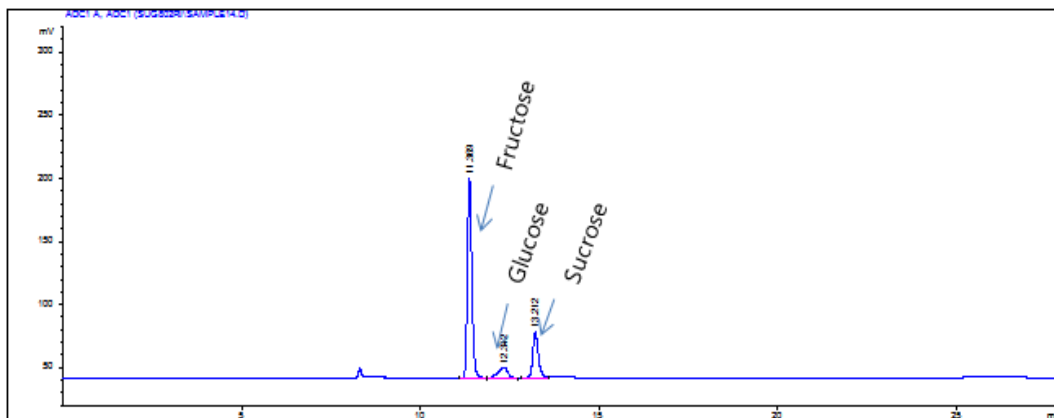


그림 123. 수박 시료 분석 결과 크로마토그램

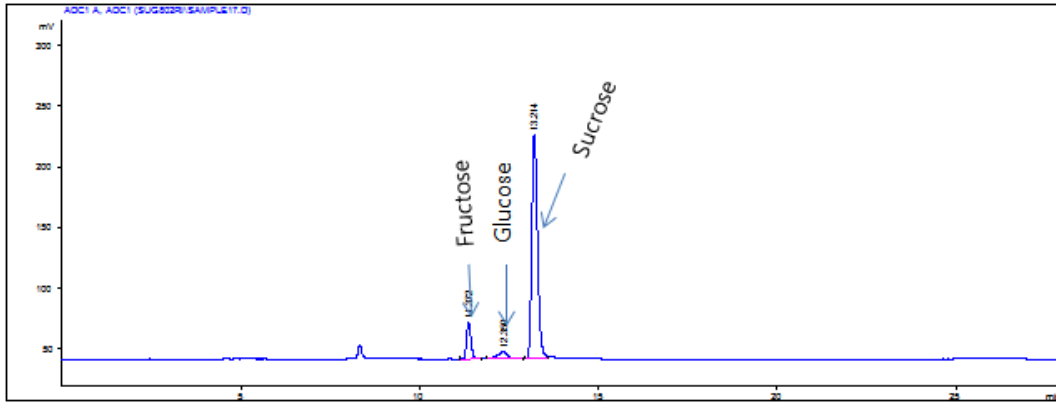


그림 124. 참외 시료 분석 결과 크로마토그램

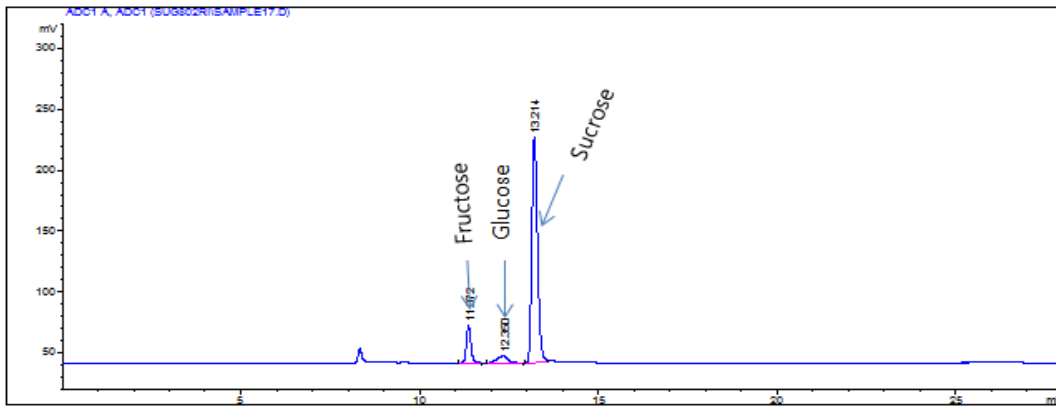


그림 125. 사과 시료 분석 결과 크로마토그램

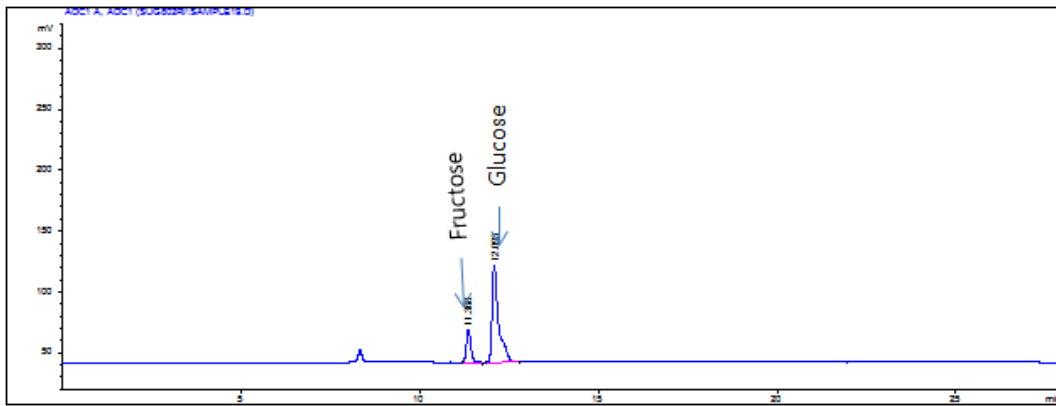


그림 126. 멜론 시료 분석 결과 크로마토그램

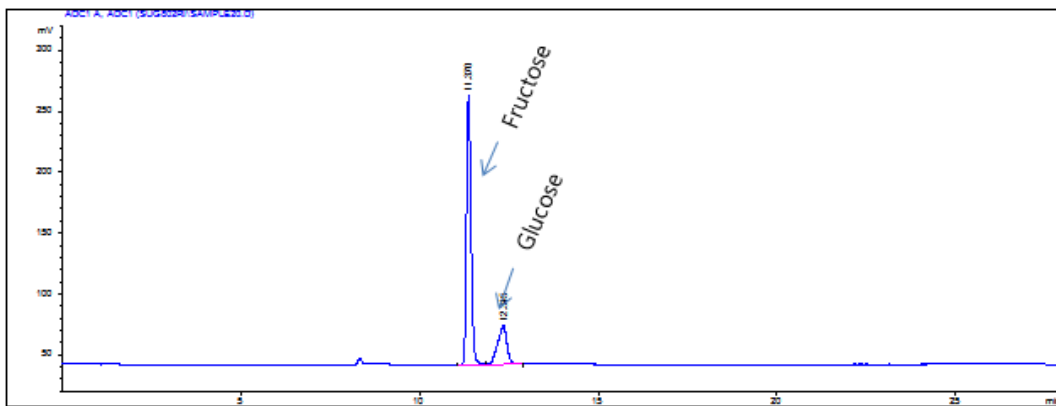


그림 127. 포도 시료 분석 결과 크로마토그램

(2) 배추 등(십자화과 식물)에 함유된 기능성물질 glucosinolates의 정밀 분석법 개발

(가) Glucosinolates

Glucosinolates는 십자화과 식물들의 2차 대사산물로서 아미노산들로부터 유래한 황, 질소 등을 함유하고 있다. 물에 잘 녹으며 글루코시드에 속한다. 겨자, 서양고추냉이, 양배추, 무, 콜리플라워, 짙은 양배추, 케일, 브로콜리, 배추 등에 존재한다. 자연에는 약 120가지의 서로 다른 glucosinolates들이 알려져 있다. Glucosinolates는 황과 질소 사이의 R group [그림 128]에 따라 Aliphatic group, Indole group, Aromatic group으로 나뉜다[표 26].

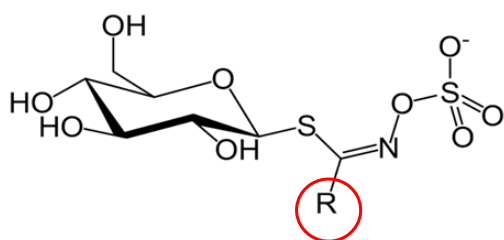


그림 128. Glucosinolates의 구조

표 26. R group에 따른 glucosinolates 종류

Aliphatic group	R
Progoitrin	$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2 -$
Glucoraphanin	$\text{CH}_3 -\text{SO}-(\text{CH}_2)_4 -$
Gluconapoleiferin	$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2 -$
Glucoalysin	$\text{CH}_3 -\text{SO}-(\text{CH}_2)_5 -$
Gluconapin	$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 -\text{CH}_2 -$
Glucobrassicinapin	$\text{CH}_2 = \text{CH}-(\text{CH}_2)_3 -$
Glucoerucin	$\text{CH}_3 -\text{S}-\text{CH}_2 -\text{CH}_2 -(\text{CH}_2)_2$
Glucoberberoin	5-methylthiopentyl
Sinigrin	$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2 -$
Indole group	
4-hydroxyglucobrassicin	4-Hydroxyindole-3-ylmethyl
Glucobrassicin	Indole-3-ylmethyl
4-methoxyglucobrassicin	4-methoxyindole-3-ylmethyl
Neoglucobrassicin	1-methoxyindol-3-ylmethyl-
Aromatic group	
Gluconasturtiin	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2 -\text{CH}_2 -$
Glucotropaeolin	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2 -$

십자화과 식물들의 2차 대사산물로서 glucosinolates는 강력한 항암작용을 하는 것으로 알려져 있는데, 방광암, 유방암, 간암 등에 효과적이다. 특히 glucosinolates는 백혈구와 사이토카인의 조율능력이 뛰어나며 유방, 간, 대장, 폐, 위, 식도 등에서 종양이 성장을 억제하는 효소를 가지고 있다. glucosinolates와 십자화과 채소 등에 들어 있는 효소 myrosinase는 보통 때는 분리되어 있다. 그러나 채소를 갈거나 다지는 등의 조리과정을 거치면 세포가 파괴되면서 myrosinase의 작용으로 glucosinoate의 포도당 계열이 분해되면서 이때 남아 있는 분자는 isothiocyanate(ITC), indole-3-carbinol(I3C), allycyanate, sulforaphane 등을 생성한다.

Glucosinolates 중 glucoraphanin의 분해 산물인 sulforaphane [그림 129]은 1992년 미국 존스 홉킨스대학의 폴 텔러리(Paul Talalay)에 의해 강력한 항산화 효과를 갖는 것으로 알려졌다. Sulforaphane에 의한 항산화 효소의 발현 유도는 산화적 손상에 의한 유전자 변형을 막아준다. 또한 위암 발생의 주요한 인자로 알려져 있는 *Helicobacter pylori*의 활성을 억제하였고. 동물실험에서 발암물질에 의해 유발된 위암의 생성을 저해하였다. Sulforaphane은 항암 및 *Helicobacter pylori*의 억제 효과 이외에 염증 유발인자 활성 저해하는 것으로 알려져 있다. 'Cancer letter'에 발표된 연구결과에 따르면 마우스를 대상으로 실시한 실험에서 sulforaphane은 피부암 억제에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 보고되었다. 또한 싱가포르 국립대학의 연구결과에 따르면 인체의 유방암 세포를 대상으로 실시한 실험에서 유방암을 효과적으로 억제하는 것으로 보고되었는데, 특히 glutathione S-transferase(GST) enzyme activity의 활동을 강화하여 많은 발암성 물질을 치료하는 것으로 알려져 있다. Sulforaphane은 phase II detoxication enzymes로 알려져 있는 quinone reductase [NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase]의 활동을 강화하여 발암물질의 성장을 억제한다.

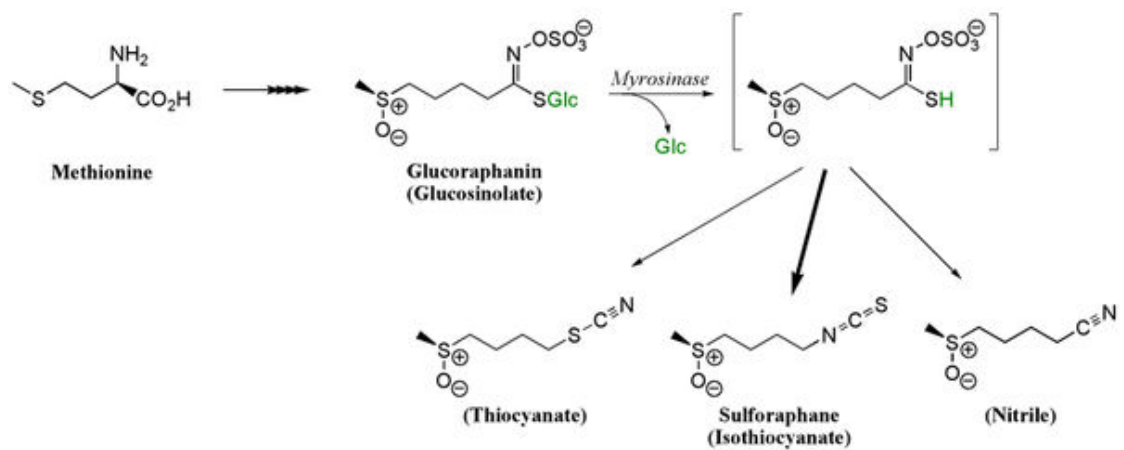


그림 129. Glucoraphanin으로부터 sulforaphane의 생성

Glucobrassicin의 분해산물인 indole-3-carbinol(I3C)[그림 130]은 독을 제거하는 효소를 자극하고 강한 항산화작용 및 항암작용을 한다. 유방과 여러 세포의 막에 장애물을 설치함으로써 에스트로젠 수용체가 자리하지 못하도록 하는 방법으로 유방암과 자궁경부암을

줄이는 역할을 한다. 또한 아플라톡신에 의한 발암작용과 구충제 및 독성에 의한 발암작용을 저지한다. I3C는 에스트라디올(estradiol) 호르몬 방출을 촉진시키고, 항증식 작용을 가지고 있으며 에스트로겐으로 야기되는 암들을 억제하는 2-하이드록시에스트론(2-hydroxyestrone)의 생산을 증가시킨다. 다른 연구에서는 암을 개시하고 촉진하는 에스트로겐인 16-알파하이드록시에스트론(16-alpha-hydroxyestrone)의 생산을 줄이는 것에 의해서 항암작용을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 발암물질에 노출된 후에 I3C를 섭취하는 것은 간장, 대장, 갑상선 등의 장기에서 오히려 암세포의 성장을 촉진하는 것으로 나타나 결과적으로 예방에 효과적인 물질로 알려지고 있다.

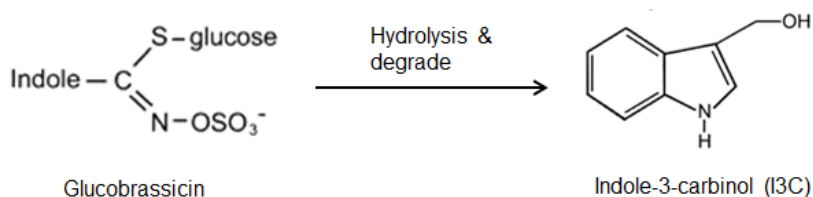


그림 130. Glucobrassicin으로부터 I3C의 생성

작물 중의 총 glucosinolates 함량은 100g 당 520 mg ~ 650 mg 정도이다. Glucosinolates는 주로 십자화가 식물인 배추, 무, 브로콜리 등에 많이 존재한다[표 27].

표 27. 작물 중의 glucosinolates 함량 (mg/100g)

작물	함량
배추	520.0
컬리플라워	544.0
곶슬겨자채	535.9
무	551.2
고추냉이	653.6
콜라드	520.1
브로콜리	532.2
케일	543.0
토스카노	524.6

(나). Glucosinolates 분석법 확립

※ 배추, 브로콜리 등의 십자화과 식물에서 glucosinolates 성분을 추출, 분석하는 방법은 다양하지만 최근 배추 23품종에서 14가지 종류의 glucosinolates 성분을 분리한 농촌진흥청 국립농업과학원(J.K. Kim et al., 2010)의 실험 방법을 적용하였다.

※ 위의 방법은 DEAE anion exchange column을 사용하여 crude 상태의 glucosinolates를 desulfoglucosinolates 상태로 만들어 HPLC-PDA와 LC-MS/MS로 분석한다.

십자화과 시료를 70% methanol 추출하면 crude glucosinolates 상태가 되는데 이 추출물을 DEAE anion exchange column에 loading하여 16 시간 동안 sulfatase 효소를 처리하면 desulfoglucosinolates[그림 131] 상태가 된다. 본 연구실에서는 배추 이외에도 다양한 십자화과 시료의 glucosinolates 성분을 알아보기 위해 양배추, 브로콜리, 무를 함께 추출하여 HPLC-UV와 UHPLC-MS/MS를 이용하여 분석 조건을 확립하였다.

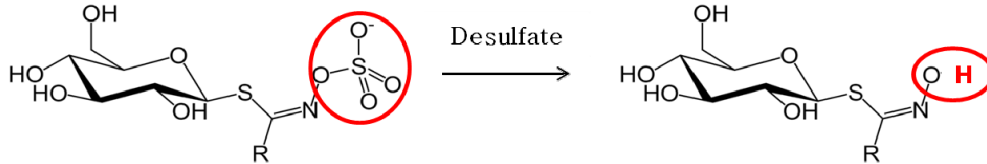


그림 131. Desulfoglucosinolates 과정

① Glucosinolates 분석용 표준용액의 제조

Glucosinolates 분석을 위한 적합한 standard가 부족하기 때문에 sinigrin(2-propenyl glucosinolates)를 external standard로 사용하여 ISO에서 제시된 response factor로 계산하는 방법을 이용한다.

김 등(2010)은 external standard로 2.5mM sinigrin을 사용하였지만 ISO(1992)에서 시료에 존재하는 glucosinolates 함량이 적을 경우 1~3mM sinigrin 농도로 낮추어 사용해도 된다고 제시되어있다. DEAE Sephadex A25 column을 사용하여 desulfosinigrin 상태로 만들었을 때, desulfosinigrin 농도는 700ppm정도 된다. 이는 상당히 높은 농도로 다른 표준품의 경우 stock solution 수준이다. 그래서 본 연구에서는 1mM sinigrin을 desulfosinigrin 상태로 만든 후 단계적으로 희석하여 50, 20, 10, 5, 2, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 용액을 각 10 μ l씩 HPLC에 주입하여 시료와 같은 농도의 sinigrin 농도를 찾고, peak area를 기준으로 response factor를 계산하였다.

Desulfosinigrin을 제조하는 방법은 다음과 같다.

Chromatography column(Mini column)에 DEAE solution 1 ml을 분주하여 충전제를 고정시키고 DW를 1 ml씩 4회 분주하였다. 1 mM sinigrin 200 μ l를 분주 후 DW로 1 ml씩 4회 분주하여 세척 하였다. Sulfatase 효소를 50 μ l 처리하고, column의 위, 아래부분을 잘 막아준 다음 16시간 동안 정치(定置)해두었다. 16시간 후 DW를 2.4 ml씩 분주하여 desulfosinigrin을 얻었다. Desulfosinigrin은 0.2 μ m syringe filter로 여과 하여 HPLC로 분석하였다.

② Glucosinolates 분석을 위한 HPLC 기기조건 확립

김 등(2010)은 배추에서 glucosinolates 분석을 위한 이동상으로 acetonitrile과 water를 사용하였는데 본 연구실에서는 LC-MS/MS 분석조건에도 활용하기 위하여 0.1% formic acid를 함유하는 acetonitrile과 water를 사용하였다. 용매 기울기 방법에서의 이동상 조성은 주로 99% DW에서 시작되어 70% DW까지 내려갔다가 다시 99% DW로 안정화시키는 방법을 사용하였는데, 이 방법을 양배추 추출물에 적용하여 분석해보았다. 그 결

과 10분 이후에 나오는 peak은 대부분 분리가 되었지만 10분 이전에 나타나는 4종류의 peak을 분리하기 위하여 gradient steepness(GS) 조건을 변경하면서 최적 분석조건을 확립하였다.

㉞ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu 10Avp HPLC
- Detector : Shimadzu UV detector (Wavelength; 227nm)
- Column : Shiseido C18 column (250 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% acetic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% acetic acid
- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 20 μ l

㉞ Gradient steepness(GS) 조건에 따른 peak 변화 비교

※ 양배추 시료의 9가지 peak를 분리하기 위해서 clean up 이전의 gradient steepness(GS)를 조절해보았다.

김 등(2010)에서 분석한 gradient 조건은 GS=1.61[표 28]이었는데 이 방법대로 분석할 경우 9가지 peak가 모두 분리되는 것을 확인하였다[그림 132]. 그러나 acetonitrile 농도가 높아지면서 6분대에서 baseline이 급격하게 높아지는데 이는 용매비율에 줄어드는 기울기가 크기 때문이다.

Time(min)	%A	%B
0	1	99
18	30	70
30	30	70
35	50	50
37	1	99
47	1	99

표 28. GS=1.61인 gradient 조건

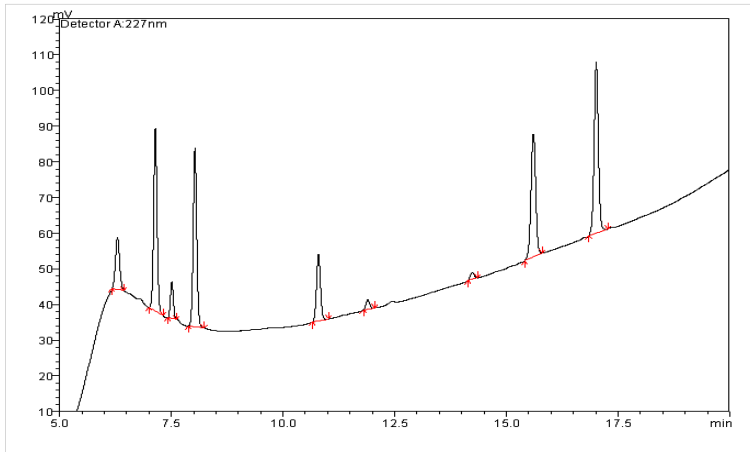


그림 132. 양배추 분석 결과 크로마토그램

■ GS=2.72일 경우 비교

김 등(2010)의 분석조건에서 30% acetonitrile 비율을 50%로 높이면서 peak 간격을 줄여 분리시간을 단축시켜보았다[표 10]. 그 결과 17분 정도 걸리던 분리시간이 13분 이내로 줄어들었고, 2번째와 3번째 peak가 겹치는 듯 보이지만 분리되어있었다[그림 133]. 그러나 시료의 농도가 높을수록 두 peak가 겹칠 수 있기 때문에 이동상의 처음 시작 농도를 나누어 실험해보았다.

Time(min)	%A	%B
0	1	99
18	30	50
23	30	50
25	1	99
35	1	99

표 29. GS=2.72인 gradient 조건

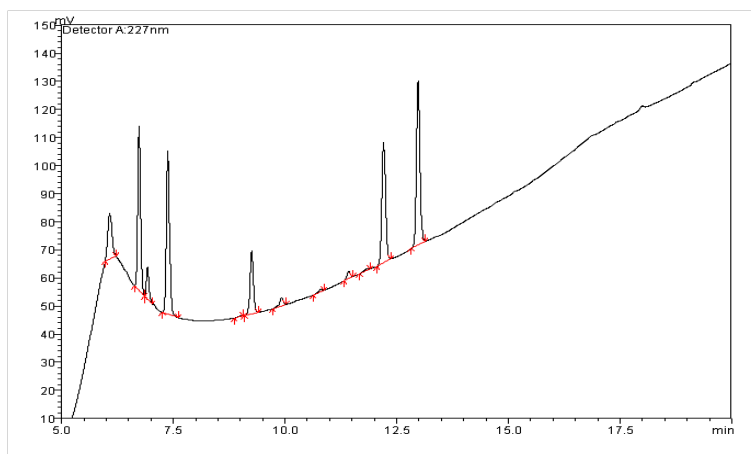


그림 133. 양배추 분석 결과 크로마토그램

■ GS=1.75(0-8분), GS=3.5(8-18분)일 경우 비교

GS=2.72의 방법과 같이 99% water에서 50% water로 18분 동안 direct로 이동하는 것이 아니라 8분까지 85%로 줄여둔 다음 50% water 진행되도록 변경해보았다[표 30]. 그 결과 GS=2.72에서 겹쳐보이던 2번, 3번 peak가 좀 더 확실하게 분리된 것을 확인하였다[그림 134].

Time(min)	%A	%B
0	1	99
8	15	85
18	30	50
23	30	50
25	1	99
35	1	99

표 30. GS=2.72인 gradient 조건

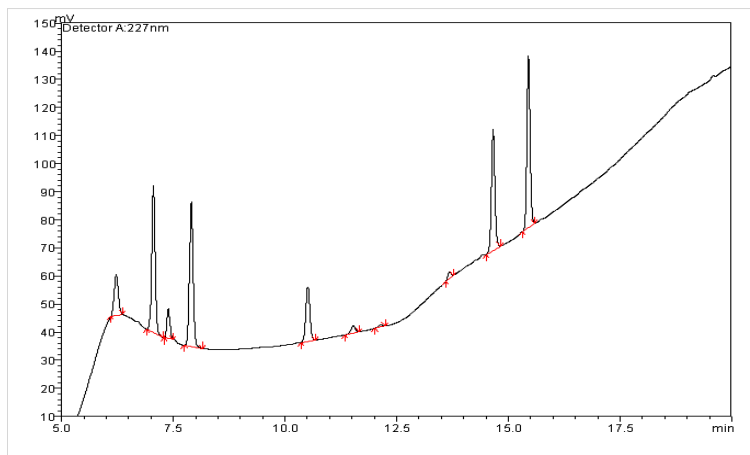


그림 134. 양배추 시료 분석 결과 크로마토그램

㊤ 시료 주입량에 따른 peak 변화 비교 크로마토그램

위의 분석 조건은 시료 주입량이 20 μ L일 때의 분석 결과이고, 분석 시간을 좀 더 늘리면서[표 12] 시료 주입량을 50 μ L로 높여 분석해보았다. GS=1로 설정하였을 때 갑작스런 기울기 현상은 줄어들었고, 시료에 함유된 glucosinolates 함량을 분석하기에 적합하였다[표 31, 그림 135].

Time (min)	%A	%B
0	1	99
29	30	70
38	30	70
40	1	99
50	1	99

표 31. Gradient progrm (GS=1)

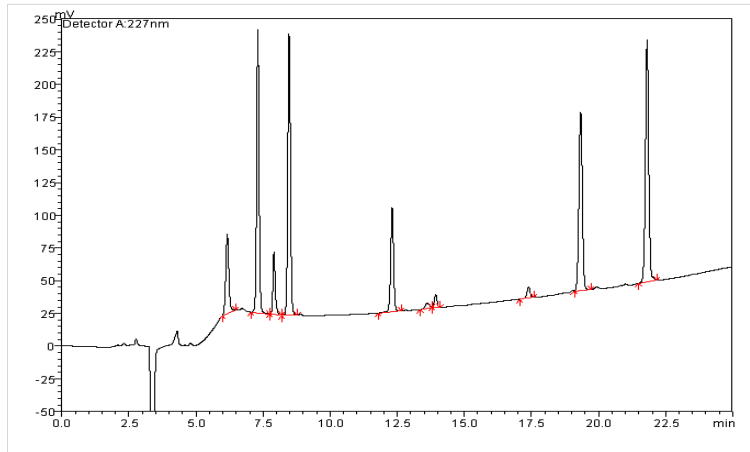


그림 135. 양배추 시료 분석 결과 크로마토그램

③ Desulfoglucosinolates 추출 방법의 확립

※ 다양한 작물의 glucosinolates 함량을 알아보기 위하여 배추, 양배추, 무, 브로콜리를 구입하여 각각 동결건조 후 냉동보관 하여 사용하였다.

※ Glucosinolates 분석을 위한 추출 과정은 J.K. Kim et al.(2010) 방법을 이용하였다.

㉠ DEAE Sephadex A25 column activation

DEAE Sephadex A25는 0.5M sodium acetate solution에 담가 하루정도 냉장보관 후 사용하였다. Rack에 chromatography column을 고정 후 DEAE solution 1 ml을 천천히 분주하였다. 충진제가 고정되면 DW를 1 ml씩 4회 분주하였다. 시료를 추출하는 동안 충진제가 마르지 않도록 cap으로 막아두었다.

㉡ Sample extraction

동결 건조된 시료 100 mg에 boiling 70% methanol 1.5 ml을 가하고 69°C water bath에서 5분간 처리하였다. 추출물을 13,000g에서 10분간 원심분리 후 상층액은 1.5 ml tube에 옮겨두었다. 위 과정을 2회 반복 하여 상층액(총 4.5 ml)을 모두 혼합하였다. Crude상태의 추출물을 미리 준비한 DEAE anion exchange column에 흘려주었다. 이때, 1 mM sinigrin은 200 μ l만 분주하였다. DW로 1 ml씩 4회 분주하여 세척 후 sulfatase solution 50 μ l를 처리하였다. Column의 위, 아래 부분을 잘 막아준 다음 overnight 하였다(16시간 처리). Overnight 후 sample 당 DW 2.4 ml을 분주하여 desulfoglucosinolates 추출물을 얻었다. 추출물은 0.2 μ m syringe filter로 여과 하여 HPLC로 분석하였다.

(다) 분석법 검증

① Sinigrin 재현성 실험

※ 최적화된 추출 및 기기 분석 조건을 바탕으로 유효성을 확인하기 위해 external standard로 사용되는 sinigrin의 재현성 확인 실험을 진행하였다.

※ 분석의 재현성 시험은 일정한 양의 표준품을 7번 이상 반복 주입 분석하여 머무름 시간(t_R), peak의 면적(Area)의 오차를 조사하는데, 전체적으로 분석기기의 안정성을 알아보기 위해 수행한다. 본 연구에서는 1mM sinigrin을 desulfosinigrin 상태로 만들어 연속으로 7번 분석한 결과, t_R , area의 반복 분석 간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다[표 32, 그림 136].

표 32. Sinigrin의 재현성 실험 결과

1mM Sinigrin	1	2	3	4	5	6	7	Average	C.V(%)
t_R	8.653	8.664	8.703	8.595	8.67	8.559	8.686	8.6	0.6
Area	1377727	1366393	1307447	1360373	1360927	1346382	1352306	1353079.3	1.7

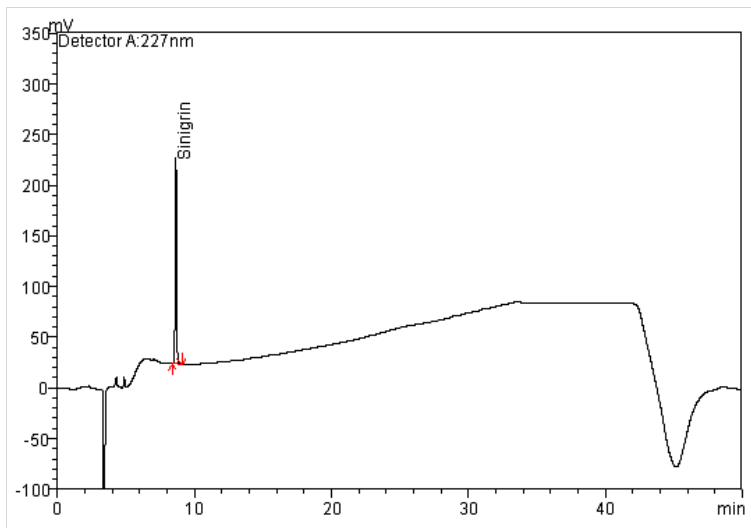


그림 136. Sinigrin 분석 결과 크로마토그램

② 작물 시료의 glucosinolates 분석 및 결과

※ HPLC-UV 및 확립/검증된 분석법을 이용하여 배추와 양배추, 무, 브로콜리의 glucosinolates 성분을 분석하였다. Glucosinolates 각 성분별 함량값을 계산하기 위해 ISO(1992)에서 제시한 response factor[표 33]을 사용하였다. Desulfosinigrin의 peak area를 RF=1로 하고 다른 glucosinolates의 peak area와 response factor를 곱해주어 정량하였다.

표 33. Response factors

Glucosinolates	Response factor (RF)
Desulfoglucobrassicin	1.07
Desulfoprogoitrin	1.09
Desulfoepi-progoitrin	1.09
Desulfosinigrin	1.00
Desulfoglucoraphanin	1.07
Desulfoglucanapoleiferin	1.00
Desulfoglucosylsinigrin	1.07
Desulfoglucosinigrin	1.11
Desulfo-4-hydroxyglucobrassicin	0.28
Desulfoglucobrassicinapin	1.15
Desulfoglucotropaeolin	0.95
Desulfoglucobrassicin	0.29
Desulfoglucosinigrin	0.95
Desulfo-4-methoxyglucobrassicin	0.25
Other desulfoglucosinolates	1.00

㉔ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu HPLC
- Detector : Shimadzu UV detector (Wavelength; 227nm)
- Column : Shiseido C18 column (250 × 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% acetic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% acetic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	1	99
30	30	70
35	80	20
40	80	20
50	1	99
60	1	99

- Flow rate : 1.0 ml/min
- Injection volume : 50 μ l

㉕ 시료 분석 결과 (Glucosinolates 함량 및 크로마토그램)

십자화과 채소에 함유된 glucosinolates 성분들은 그 종류에 따라 다양하게 나타났다. 배

추에는 glucobrassicinapin 성분이 466.6 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 나타났고, 4-methoxyglucobrassicin, glucobrassicin 순으로 높은 함량을 나타냈다[표 34]. 양배추는 주로 progoitrin과 glucoraphanin이 300 $\mu\text{g/g}$ 이상으로 높은 함량을 나타냈다[표 35]. Unknown 성분은 glucosinolates 중의 한 성분으로 생각되지만 MS 분석을 통하여 확인된 질량값으로는 어떤 glucosinolates인지 파악되지 않았다. 무 시료의 경우 glucoerucin 성분이 225.4 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 나타났고, 4-hydroxy-, 4-methoxy-glucobrassicin 성분이 존재하는 것을 확인하였다[표 36]. 브로콜리에서도 glucobrassicin 계열 성분이 관찰되었으나 배추나 양배추, 무에 비해서는 그 함량이 적게 나타났다[표 37].

각 시료별 total glucosinolates 함량을 비교해보면, 배추가 1317.0 $\mu\text{g/g}$ 으로 총 함량이 높으면서 가장 많은 glucosinolates 성분들을 함유하고 있었다. 그 다음으로는 양배추> 무>브로콜리 순이었다. 그러나 십자화과 채소 각각의 glucosinolates 성분이 다르고 그 종류도 다양하기 때문에 작물별 glucosinolates 성분을 구분하여 사용할 예정이다[표 34-37, 그림 137-140].

표 34. 배추 시료의 glucosinolates 함량 ($\mu\text{g/g}$)

배추	1	2	3	Average	C.V(%)
Progoitrin	130.0	129.1	125.8	128.3	1.7
Glucolysin	140.4	139.3	133.4	137.7	2.8
Gluconapin	43.3	43.3	43.1	43.2	0.3
Unknown	70.6	77.1	87.5	78.4	10.9
Glucobrassicinapin	466.6	464.6	460.9	464.0	0.6
Glucoerucin	3.8	3.7	3.5	3.7	4.3
Glucobrassicin	153.2	159.9	152.5	155.2	2.7
4-methoxyglucobrassicin	176.3	182.5	179.1	179.3	1.7
Glucoberteroin	50.5	49.1	48.6	49.4	2.0
Neoglucobrassicin	76.3	81.8	75.2	77.8	4.5
Total	1310.9	1330.3	1309.7	1317.0	0.9

표 35. 양배추 시료의 glucosinolates 함량 ($\mu\text{g/g}$)

양배추	1	2	3	Average	C.V(%)
Glucobrassicin	105.2	96.2	94.8	98.7	5.7
Progoitrin	310.4	285.4	276.5	290.8	6.0
Sinigrin	60.1	55.1	54.4	56.5	5.5
Glucoraphanin	311.5	291.3	280.5	294.5	5.3
Gluconapin	138.6	132.1	126.9	132.5	4.4
Unknown	27.3	26.4	25.3	26.4	3.7
Unknown	14.6	13.0	13.1	13.6	6.8
Glucobrassicin	68.7	66.5	68.9	68.0	2.0
4-methoxyglucobrassicin	80.1	75.9	77.8	77.9	2.7
Total glucosinolates	1116.7	1041.8	1018.2	1058.9	4.9

표 36. 무 시료의 glucosinolates 함량 ($\mu\text{g/g}$)

무	1	2	3	Average	C.V(%)
Glucoraphanin	19.6	15.5	21.1	18.7	15.3
4-hydroxyglucobrassicin	28.5	44.6	28.0	33.7	28.0
Glucoerucin	216.2	222.2	237.9	225.4	5.0
4-methoxyglucobrassicin	34.8	37.3	34.6	35.5	4.2
Total glucosinolates	300.1	321.6	324.6	315.4	4.2

표 37. 브로콜리 시료의 glucosinolates 함량 ($\mu\text{g/g}$)

브로콜리	1	2	3	Average	C.V(%)
Unknown	82.9	76.1	86.7	81.9	6.6
Glucobrassicin	14.4	13.8	14.6	14.2	3.0
4-methoxyglucobrassicin	15.1	15.3	16.6	15.6	5.1
Neoglucobrassicin	60.6	54.7	53.1	56.2	7.0
Total glucosinolates	174.0	161.8	174.0	169.9	4.1

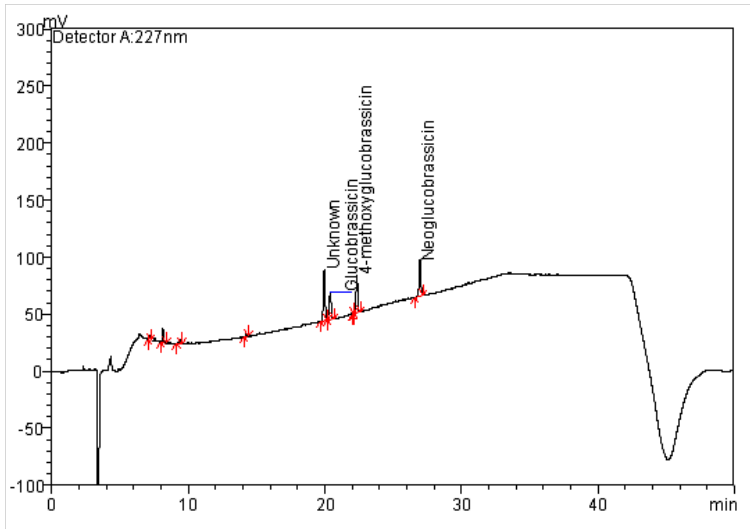


그림 140. 브로콜리 시료 분석 결과 크로마토그램

(라). UHPLC-MS/MS를 이용한 glucosinolates 분석법 확립 실험

※ UHPLC는 Ultra-HPLC로 일반 LC에 비해 더 높은 압력으로 용매를 이송시킬 수 있어서, 입자가 더 작은 column을 사용하여 높은 분리능을 나타내면서 분석시간을 단축시키고, 높은 정밀도와 안정성 및 내구성이 높은 장점이 있다.

※ MS는 glucosinolates의 분자량을 확인하여 어떤 glucosinolates인지를 알아낼 수 있기 때문에 HPLC에 비해서 정성과 정량을 동시에 할 수 있는 장점이 있다.

※ MS/MS는 원하는 glucosinolates 분자를 선택적으로 선별해서 에너지를 가해 분열시켜서 발생한 product 조각이온을 이용해 구조를 확인할 수 있고 또한 product 이온을 정량에 사용할 수 있다.

※ 본 연구실에서는 Shimadzu사의 UHPLC-MS/MS system (Shimadzu LCMS-8030)을 사용하여 다양한 glucosinolates 성분들을 분석할 수 있는 최적화 조건을 확립하기 위한 실험을 진행하였다.

※ 분석법 확립의 순서는

- ① Sinigrin의 MS/MS조건을 최적화 하고(Optimization)
- ② Neutral loss scan법을 이용하여 시료에 포함된 glucosinolates를 확인 검출한 다음
- ③ 각각의 glucosinolates의 분자이온을 이용한 SIM(Single ion monitoring)법으로 검출하여 정량하였다.

① Sinigrin의 MS/MS optimization

※ Optimization은 glucosinolates의 분자이온을 뽑아서 분열시키고, 이때 생긴 product ion을 검출하는데 관련된 Q1, CE, Q3 조건을 확립하는 과정이다. 다양한 glucosinolates의 대표물질로 sinigrin을 사용하므로 sinigrin을 사용하여 MS/MS optimization을 수행하였다.

㉞ Sinigrin의 optimization

Sinigrin optimization을 통하여 Q1 prebias, collision energy, product ion의 m/z, Q3 prebias를 알 수 있다.

㉞ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu LCMS-8030
(equiped with LC-30AD pump, SIL-30AC autosampler, CTO-30A column oven, SPD-20A UV-Vis detector and MS 8030 mass spectrometer)
- Ionization and analyzer type : ESI(electro spray ionization) and Ion trap
- Column : Kinetex C18 column (100 X 2.1 mm, 2.6 micron)
 - Column oven temperature : 40 °C

- Mobile phase
 - Solvent A : Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid
 - 5% B isocratic method
- Flow rate : 0.2 ml/min
- Injection volume : 10 μ l
- MS Analytical conditions
 - DL temperature : 250 $^{\circ}$ C
 - Heat block temperature : 400 $^{\circ}$ C
 - Interface(ESI) voltage : 4.5 kV
 - Drying gas flow : 15.0 L/min
 - Nebulizing gas flow : 3.0 L/min
 - Mass range : 100 ~ 450 m/z

⊕ Optimization 결과

▣ Q1 prebias 결과

Q1 prebias 결과 sinigrin의 질량값이 280임을 확인하였다[그림 141, 142].

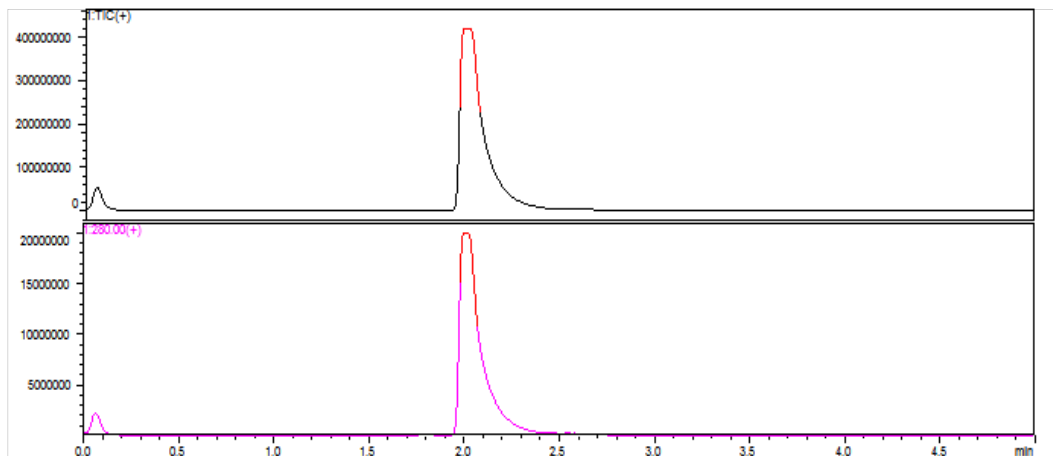


그림 140. Sinigrin의 Q1 prebias 결과 크로마토그램

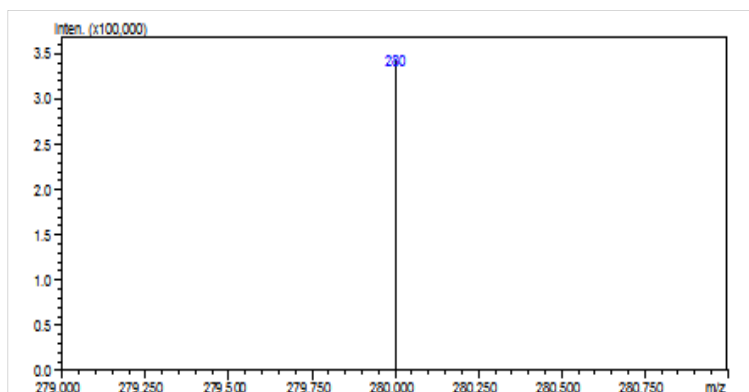


그림 141. Sinigrin의 MS spectrum

■ CE select 결과

CE select는 -50부터 -10까지 5 단위로 collision energy값을 설정하여 9번 분석한다. 그 결과 sinigrin은 27부터 145까지 다양한 질량으로 쪼개진다. 그 중 가장 좋은 peak를 나타내는 전압이 -10 V임을 확인 하였다[그림 142, 143].

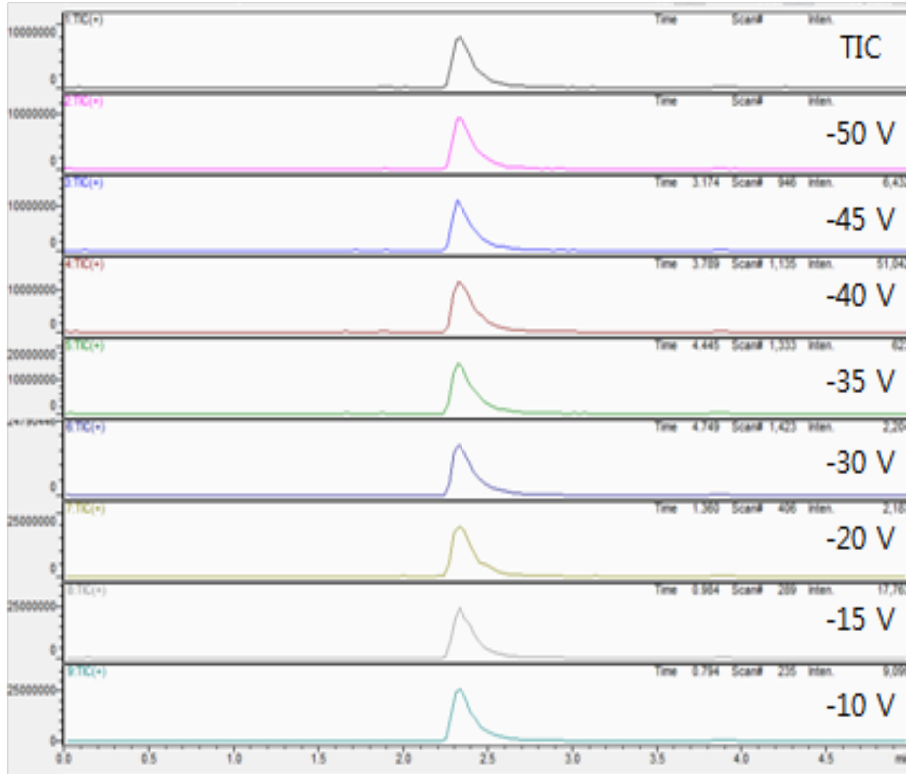


그림 142. CE select 분석 결과 크로마토그램

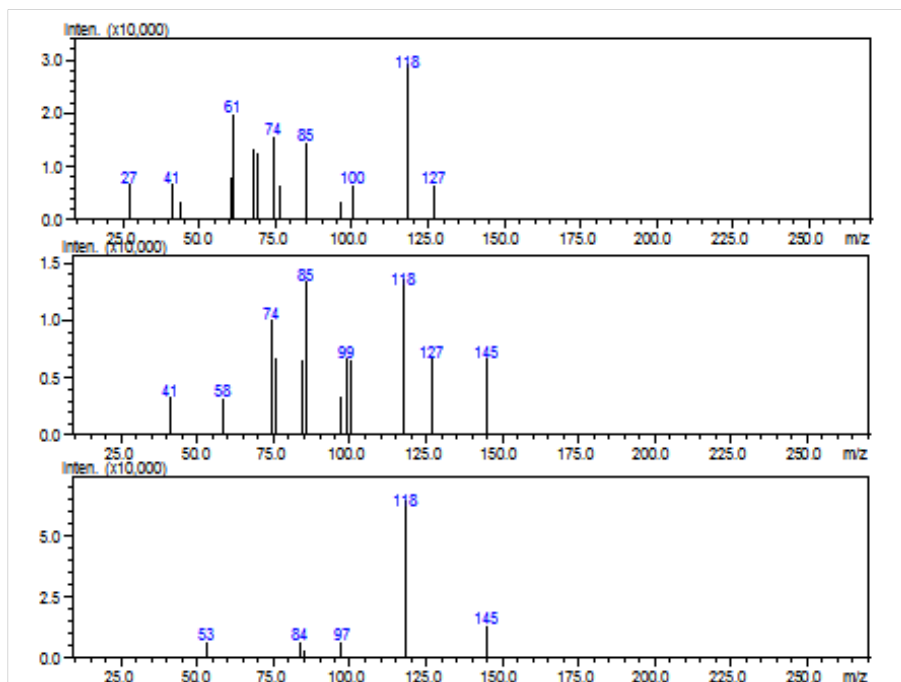


그림 143. CE select MS spectrum

■ Product 결과

Product는 CE에서 가장 좋은 peak를 나타낸 3개의 전압을 확인 후 임의로 설정된 voltage 값으로 재분석하게 되는데 이때 0.1 m/z 단위로 분석한다. Product ion값은 118, 85, 145임을 확인하였다[그림 144].

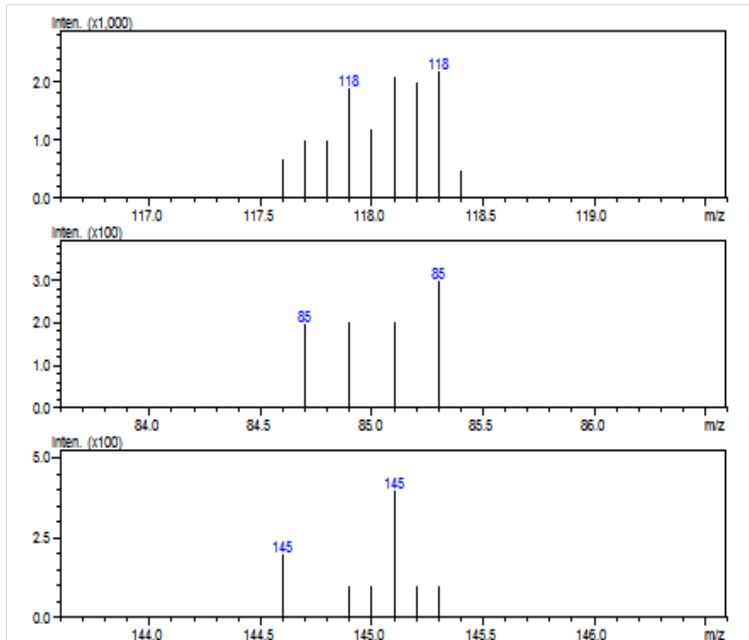


그림 144. Product ion MS spectrum 크로마토그램

■ Q3 prebias 결과

Q3 prebias는 Q1 prebias부터 product까지 확인된 결과를 바탕으로 한 번 더 peak를 확인한다. 최종적으로 sinigrin의 target ion은 118, support ion은 85와 145임을 확인하였다[그림 145, 146].

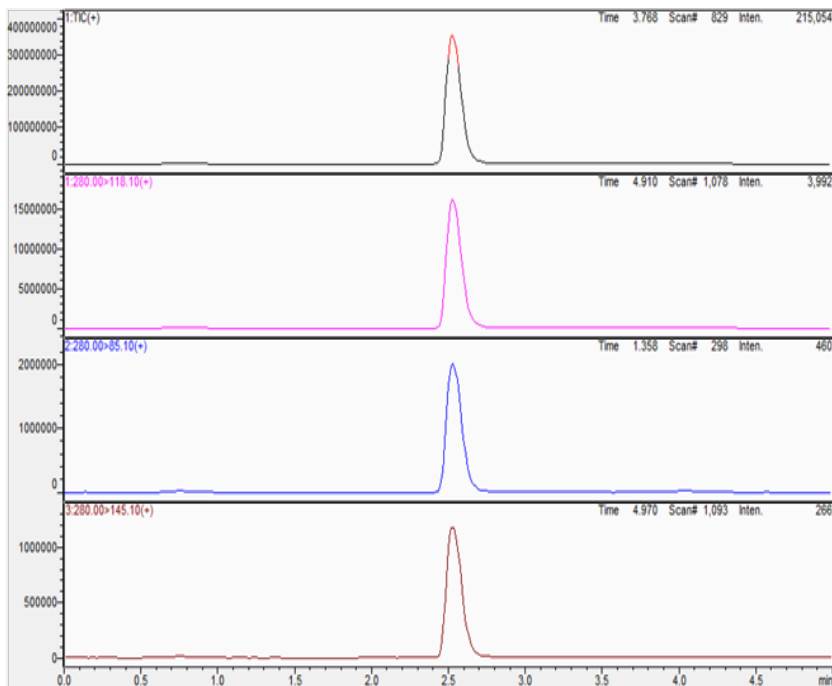


그림 145. Q3 prebias 결과 크로마토그램

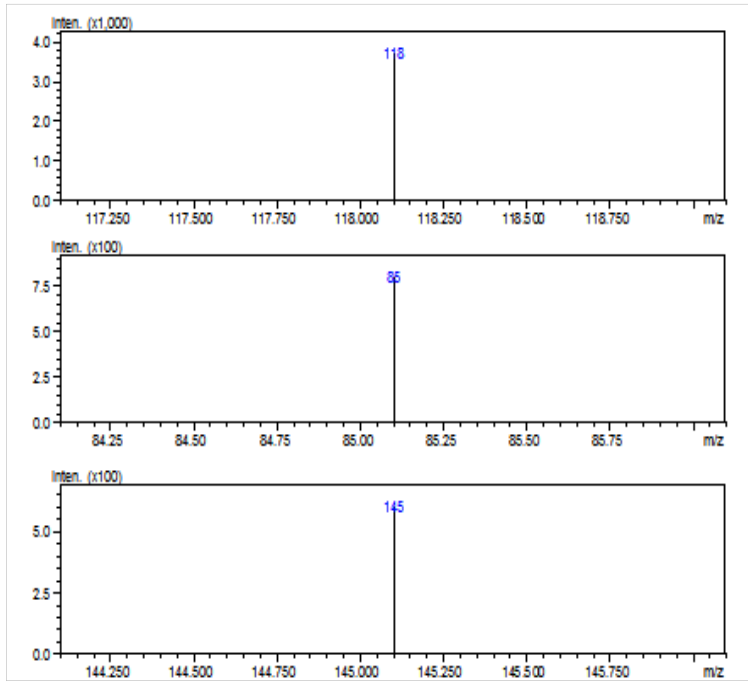


그림 146. Q3 prebias MS spectrum

■ Optimization 결과

Sinigrin의 MS/MS optimization 결과는 표 38과 같으며 다음 단계의 neutral loss scan에 사용하였다.

표 38. Sinigrin의 MS/MS optimization 결과

	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias(V)
Sinigrin	-30	-10	-25

② Neutral loss scan 분석

※ Desulfoglucosinolates는 glucosyl 구조를 공유하는데, MS/MS의 조건하에서 분자량 162.1의 neutral fragment를 공통적으로 잃게 된다. 따라서 질량값 162의 neutral loss scan을 사용하면 다양한 물질이 혼합된 시료에서도 glucosinolates만 검출하여 확인할 수 있다.

※ Optimization 결과를 통해서 가장 좋은 peak를 나타내는 collision energy(-10 V)를 선택하여 십자화과 채소의 glucosinolates 성분을 분석해보았다.

㉞ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu LCMS-8030
(equiped with LC-30AD pump, SIL-30AC autosampler, CTO-30A column oven, SPD-20A UV-Vis detector and MS 8030 mass spectrometer)
- Isonization and analyzer type : ESI(electro spray ionization) and Ion trap
- Column : Kinetex C18 column (100 × 2.1 mm, 2.6 micron)

- Column oven temperature : 40 °C
- Mobile phase
- Solvent A : Water + 0.1% formic acid
- Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid
- Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	99	1
1	99	1
3	95	5
13	20	80
20	20	80
22	99	1
30	99	1

- Flow rate : 0.2 ml/min
- Injection volume : 10 μ l
- MS Analytical conditions
 - DL temperature : 250 °C
 - Heat block temperature : 400 °C
 - Drying gas flow : 15.0 L/min
 - Nebulizing gas flow : 3.0 L/min
 - Neutral loss m/z : 162
 - Mass range : m/z 172 ~ 450
 - Collision Energy : -10 V

㉔ 시료 분석 결과

■ Sinigrin 분석 결과

Sinigrin을 neutral loss scan으로 분석한 결과 질량값 280이 나타나는 것을 확인하였다 [그림 147, 148].

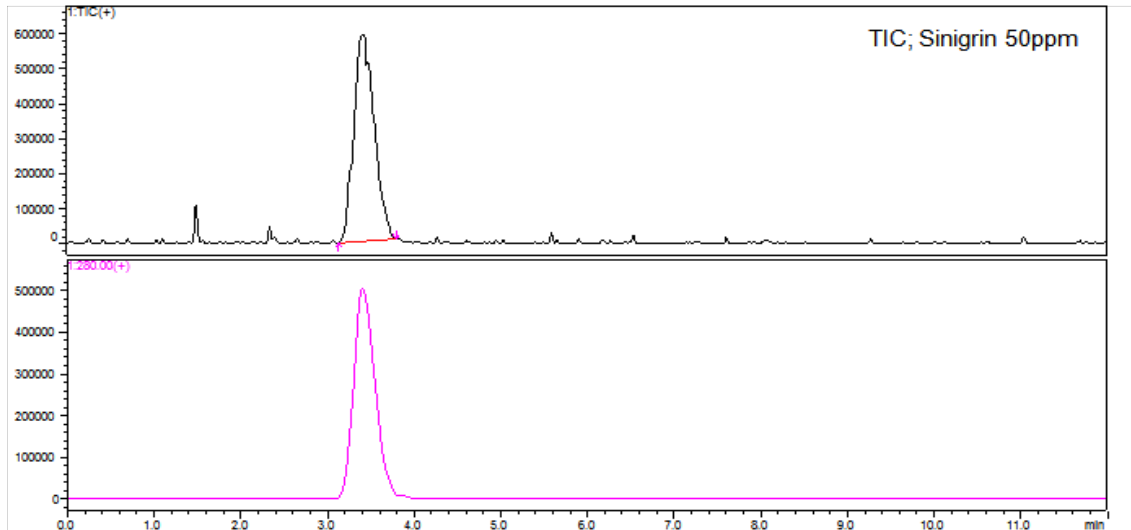


그림 147. Sinigrin 분석 결과 크로마토그램

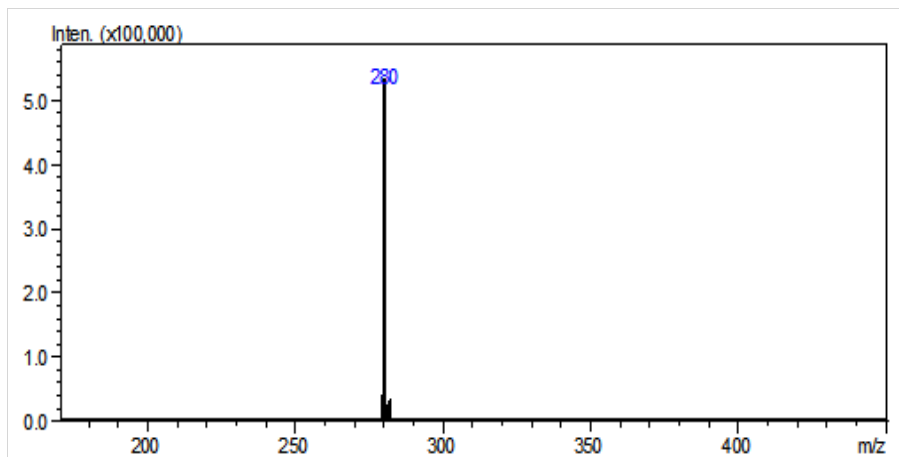


그림 148. Sinigrin MS Spectrum

▣ 배추 시료 분석 결과

배추 시료 분석 결과 glucoalyssin(372), gluconapin(294), glucobrassicinapin(306), glucobrassicin(369), 4-methoxyglucobrassicin(399), neoglucobrassicin(399)로 총 6종의 glucosinolates 성분이 검출되었다[그림 149, 150].

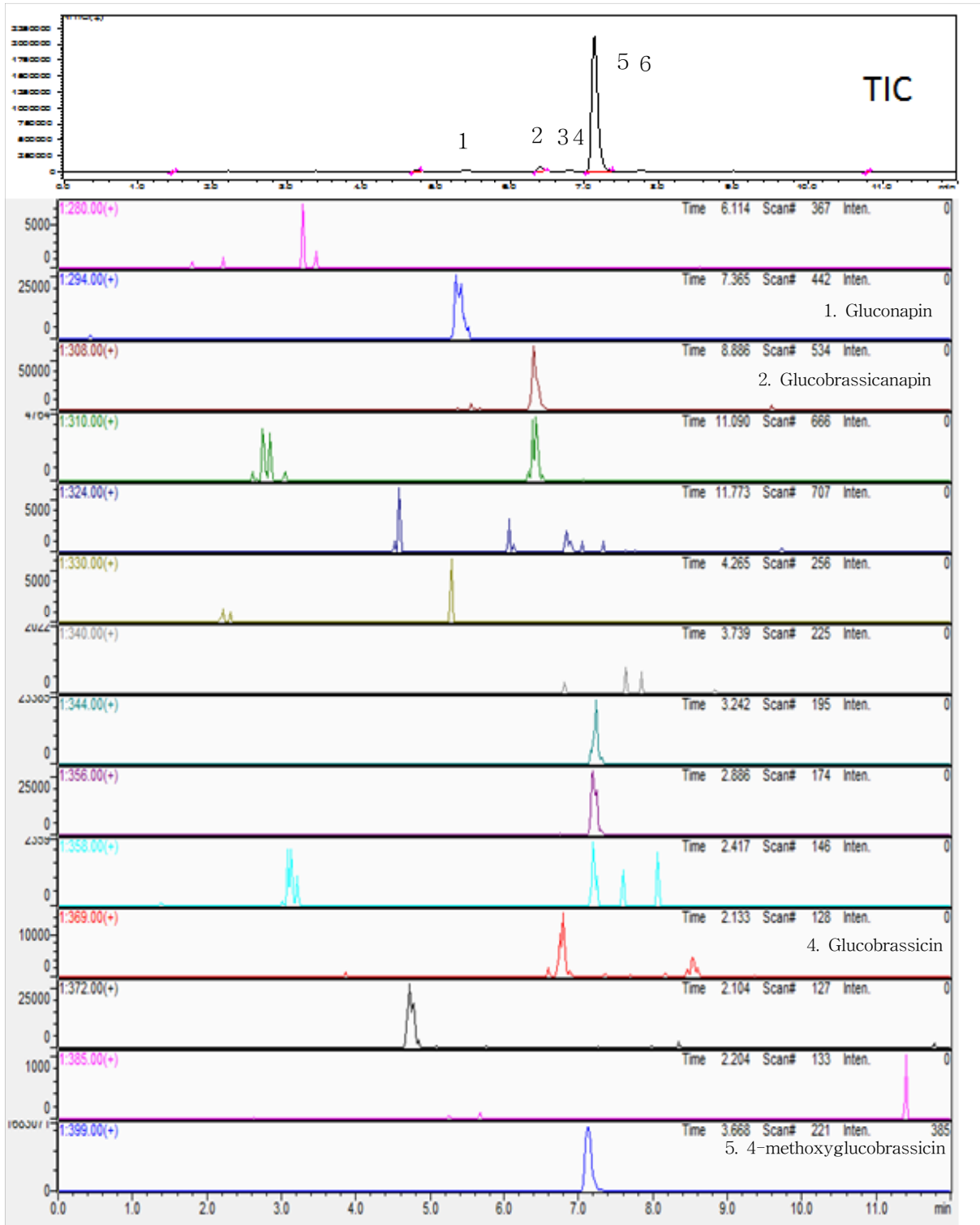


그림 149. 배추 시료 분석 결과 크로마토그램

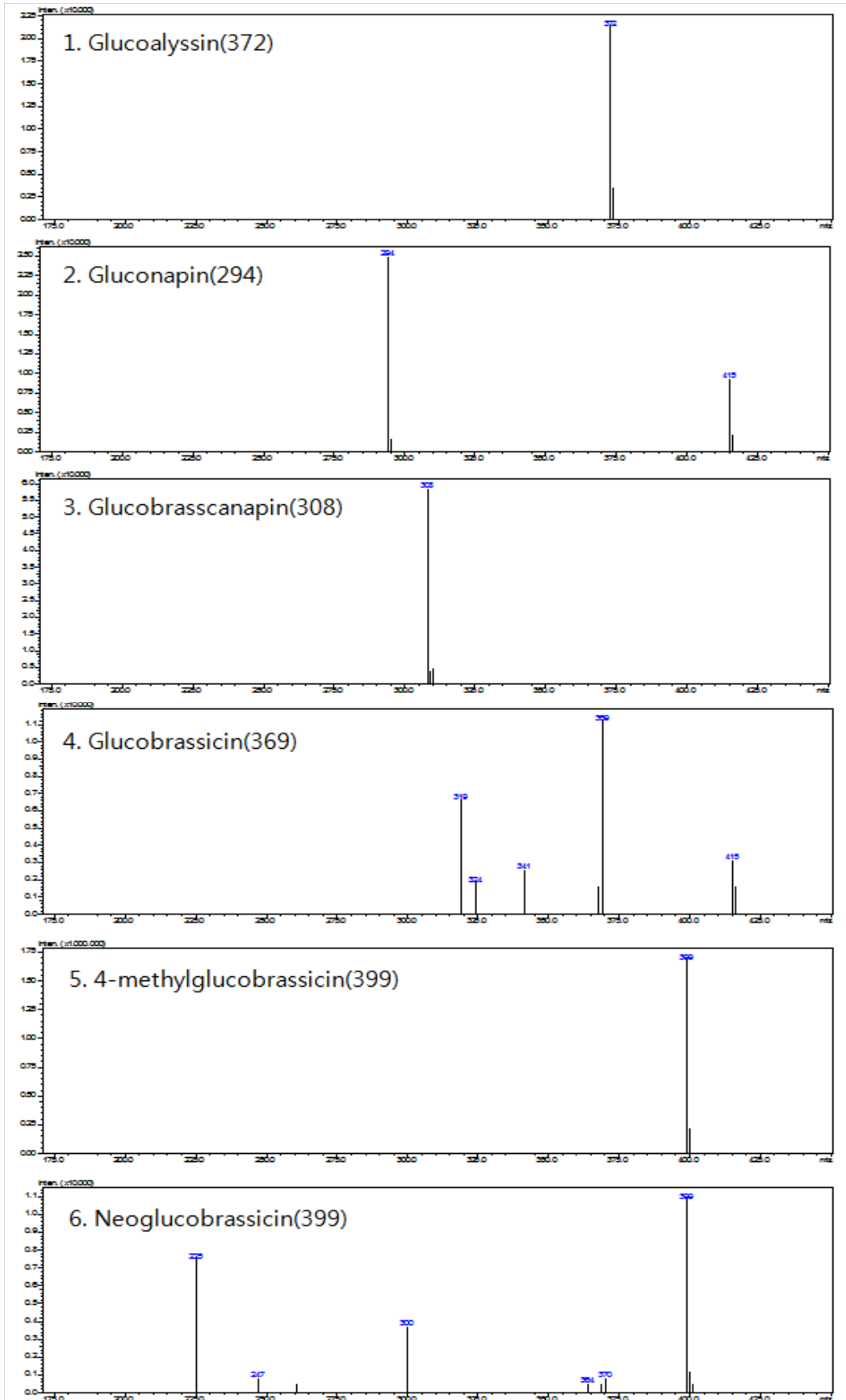


그림 150. 배추 MS Spectrum

■ 양배추 시료 분석 결과

양배추 시료에서는 총 9종의 glucosinolates 성분이 나타났는데 그 종류로는 glucoiberin(344), progoitrin(310), sinigrin(280), glucoraphanin(358), gluconapin(294), glucoerucin(340), 4-methoxyglucobrassicin(399) 으로 총 7종의 glucosinolates 성분이 확인되었다[그림 151, 152]. 나머지 2종은 아직 어떤 glucosinolates 종류인지 파악되지 않았다.

M. Mayer (2008) 적양배추의 glucosinolates 성분을 분석하였는데, 그 결과와 비교해 보면 확인된 7종은 나타나는 순서가 거의 일치하였다. 그러나 4-hydroxyglucobrassicin, glucotropaeolin, glucobrassicin, neoglucobrassicin 성분은 나타나지 않았다.

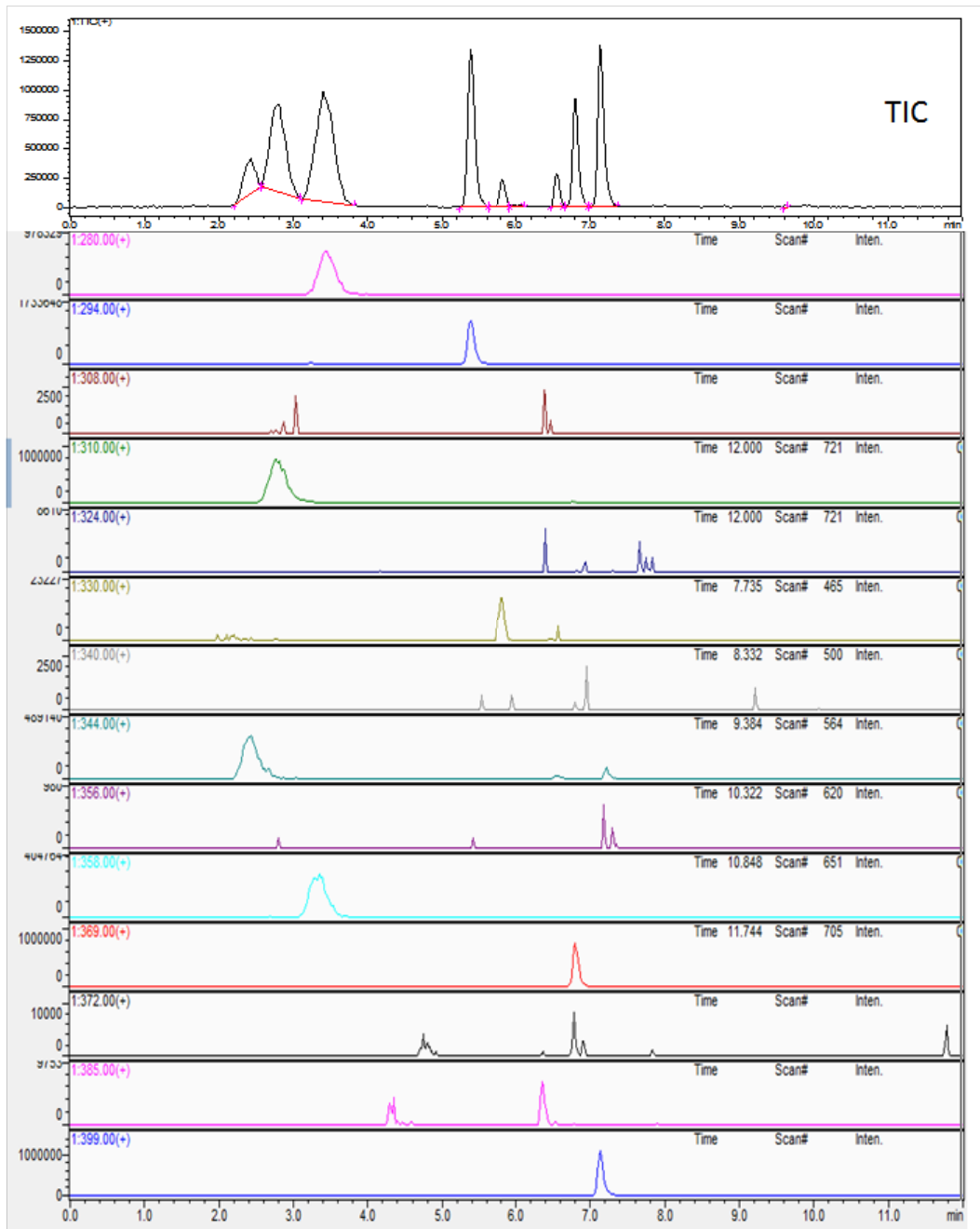
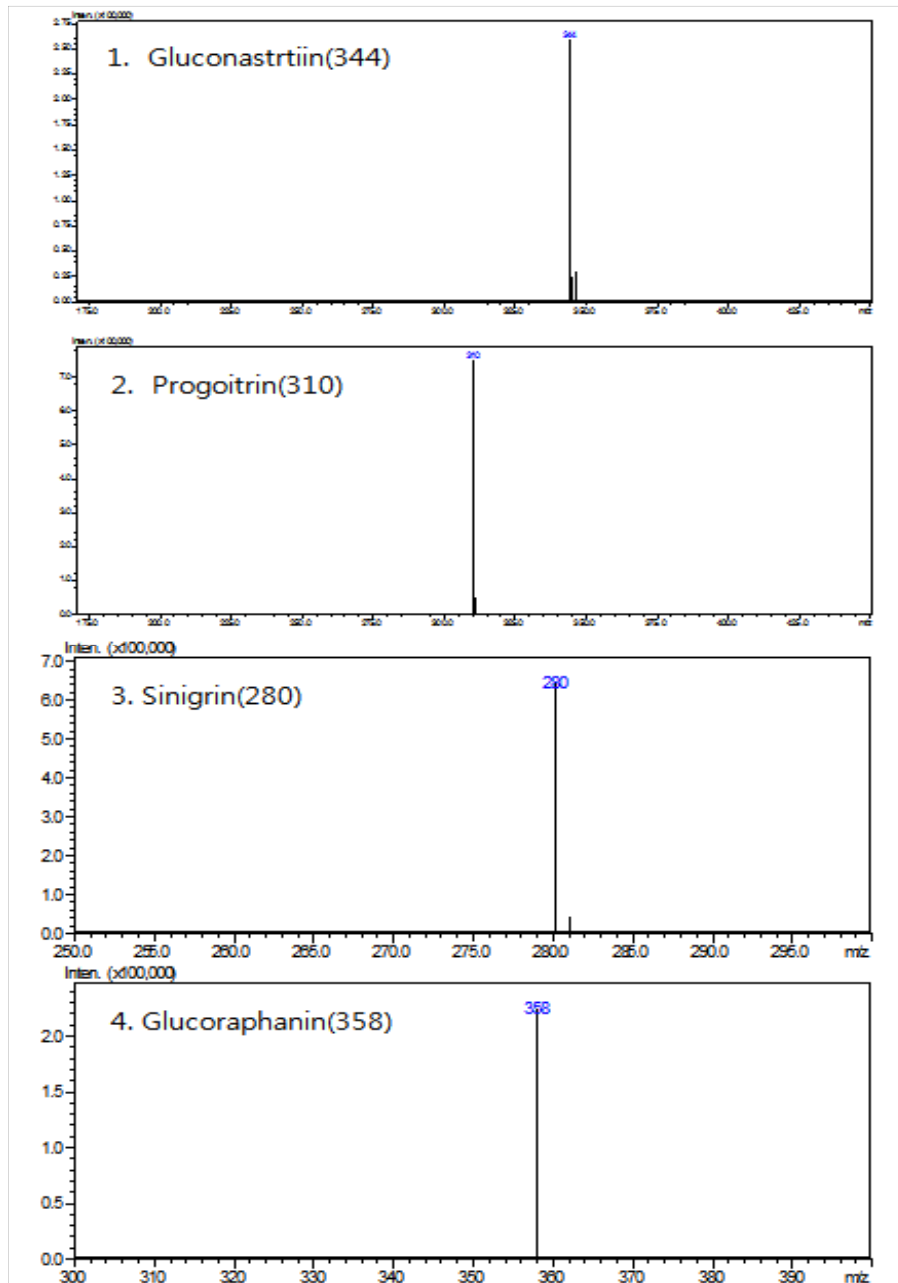


그림 151. 양배추 시료 분석 결과 크로마토그램



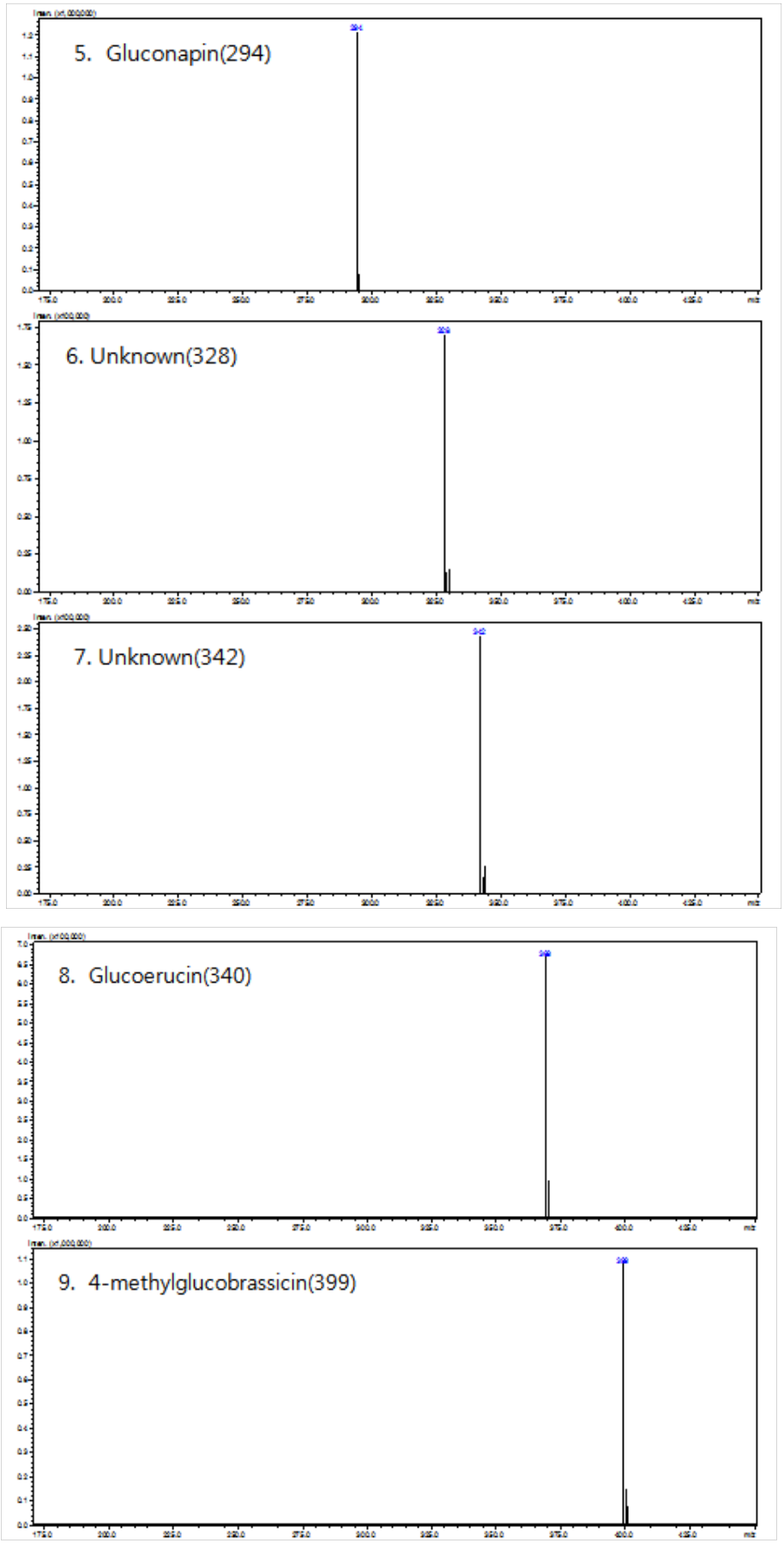


그림 152. 양배추 시료 MS Spectrum

■ 무 시료 분석 결과

무 시료를 분석한 결과 glucoberteroin(356), 4-hydroxyglucobrassicin(385) glucoerucin(340), 4-methoxyglucobrassicin(399) 4종의 glucosinolates 성분이 발견되었다[그림 153, 154].

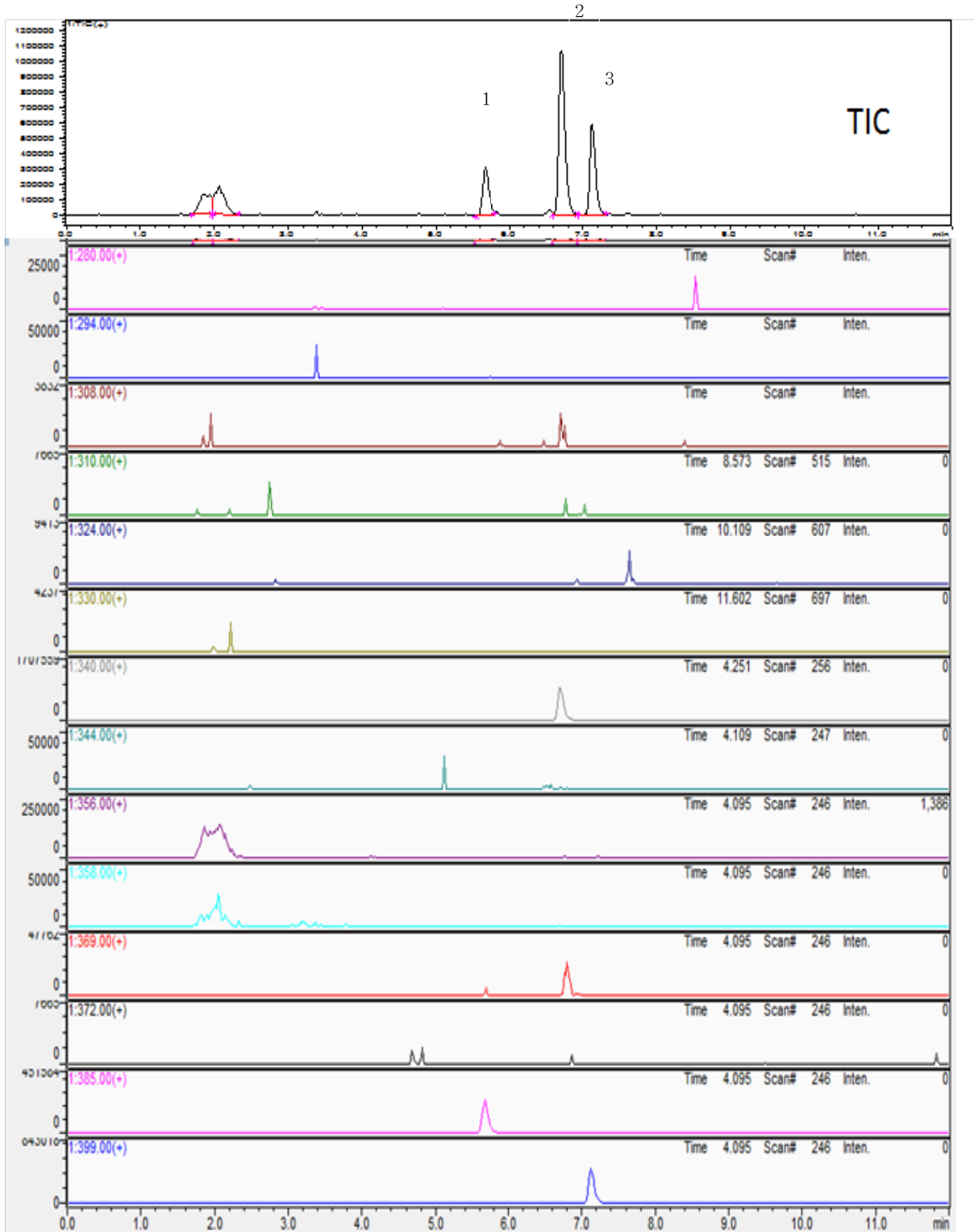


그림 153. 무 시료 분석 결과 크로마토그램

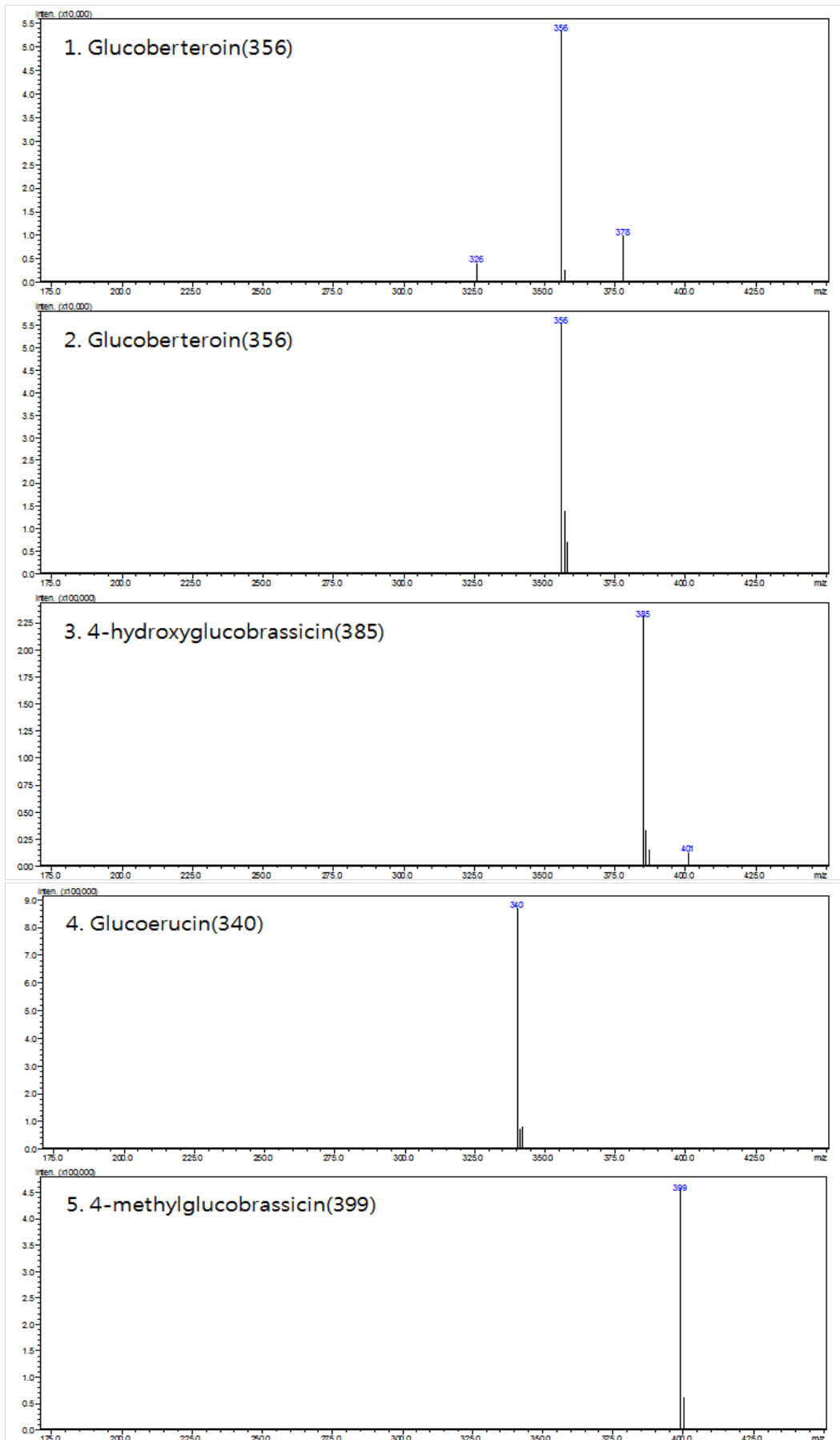


그림 154. 무 시료 MS Spectrum

■ 브로콜리 시료 분석 결과

브로콜리 꽃 시료를 분석한 결과 glucobrassicin(369), 4-methoxyglucobrassicin(699), neoglucobrassicin(399) 3종의 glucosinolates만이 분리되었다[그림 155, 156]. M. Mayer (2008)는 브로콜리의 glucosinolates 성분을 분석하였는데, 그 결과와 비교해보면 확인된 3종은 거의 일치하였다. 그러나 gluciberin, glucoraphanin, 4-hydroxyglucobrassicin은 나타나지 않았다.

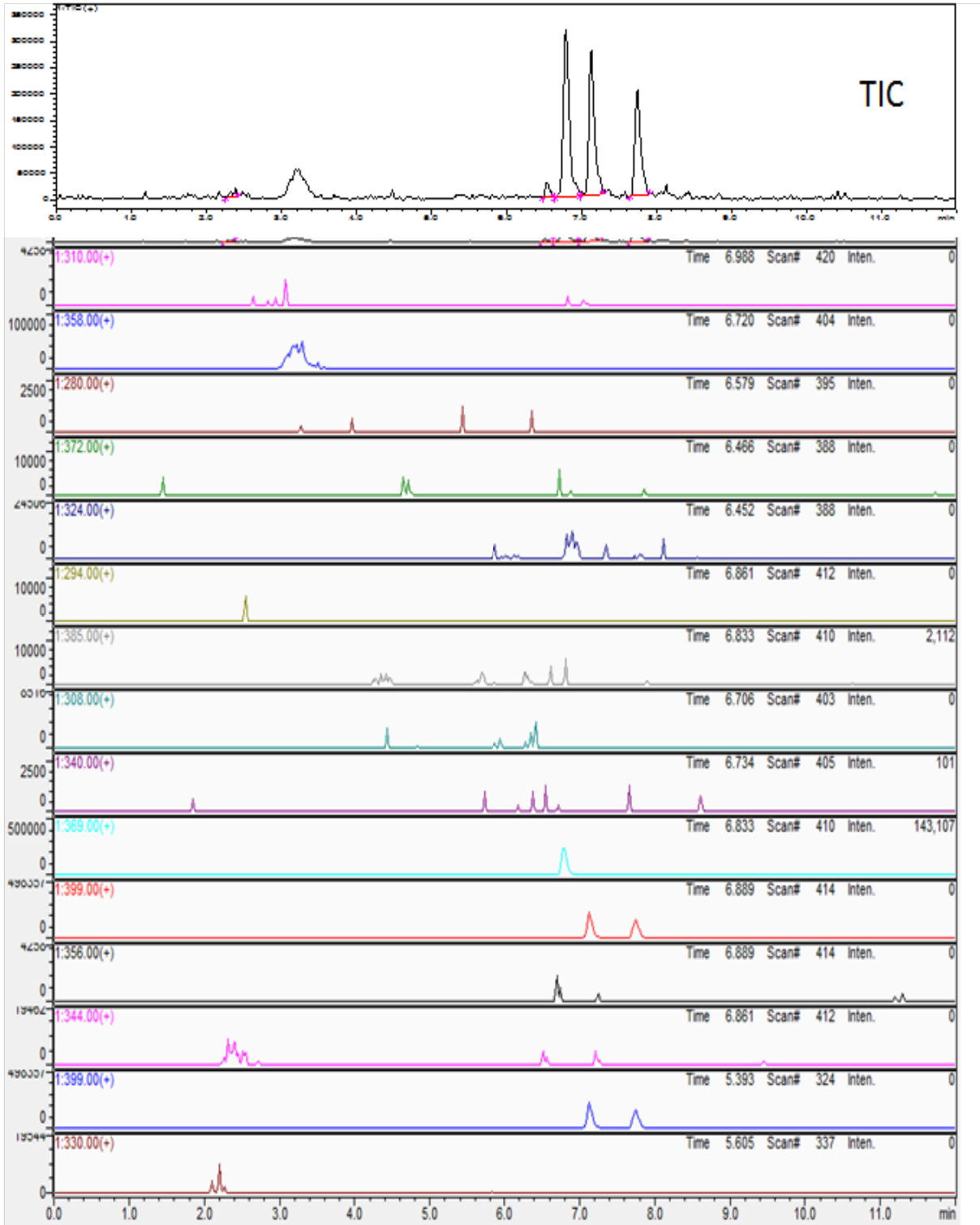


그림 155. 브로콜리 시료 분석 결과 크로마토그램

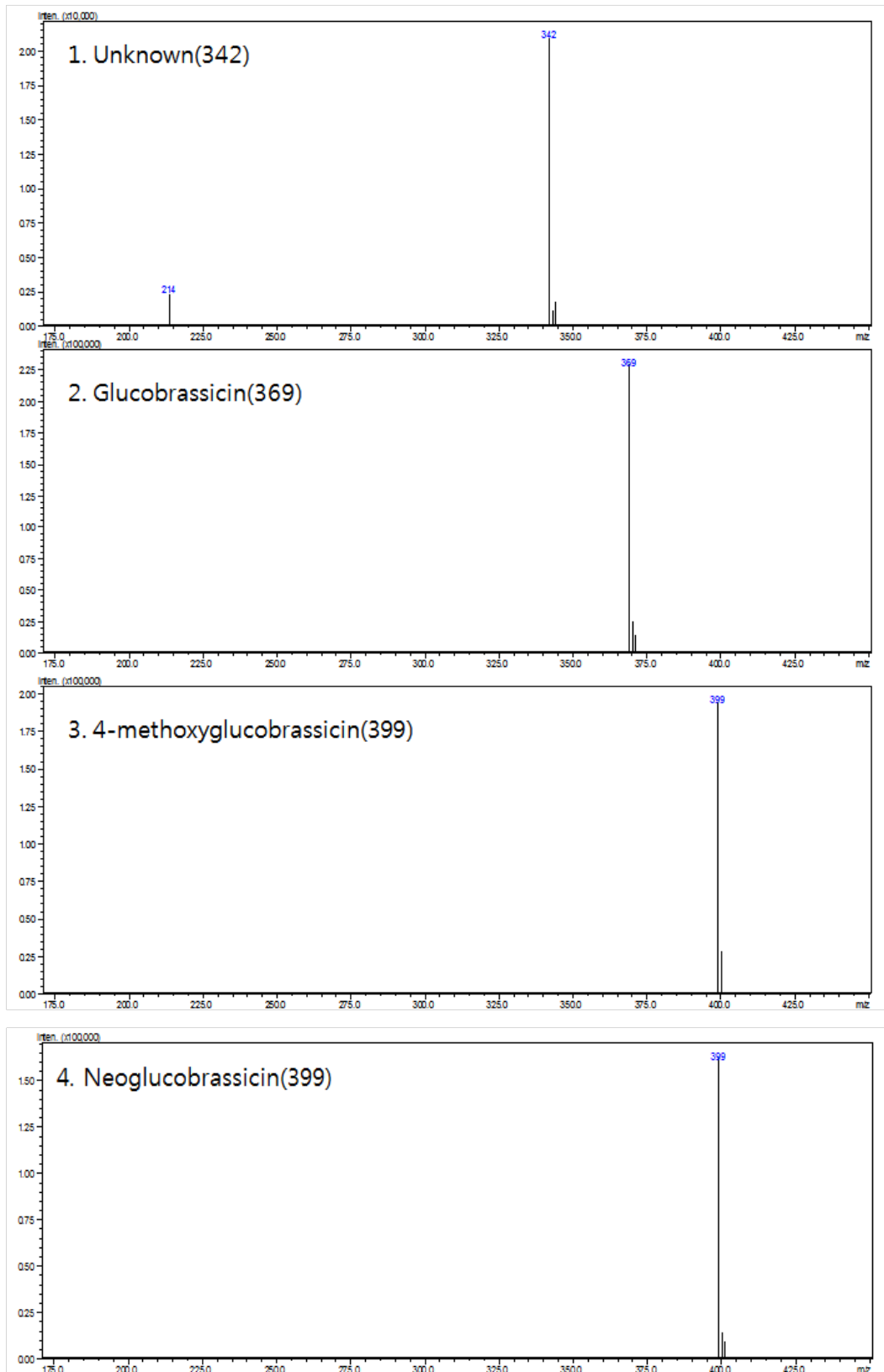


그림 156. 브로콜리 시료 MS spectrum

③ 분석법 검증

▣ Sinigrin 재현성 확인

※ Sinigrin의 재현성 실험을 통하여 분석기기의 안정성을 알아보고, 확립된 분석조건의 유효성을 확인하였다.

※ 본 연구에서는 Desulfosinigrin 50ppm을 연속으로 6번 분석한 결과, t_R , area의 반복 분석 간 오차가 작아 기기 가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인 하였다 [표 39].

표 39. Sinigrin의 재현성 실험 결과

Sinigrin 50ppm	1	2	3	4	5	6	Average	C.V(%)
t_R	3.38	3.33	3.36	3.34	3.35	3.31	3.35	0.77
Area	27979747	28480985	27900450	28114451	28028653	28051023	28092552	0.72

④ SIM(Single Ion Monitoring) 분석법 확립

※ Neutral loss scan은 glucosinolates만 확인할 수 있는 좋은 방법이지만 정량성을 보증할 수 없어서 각 glucosinolates의 분자이온($[M+H]^+$)만을 사용하는 SIM법으로 정량법을 확립하였다. 장점으로서는 정성과 정량을 동시에 할 수 있고, peak이 겹쳐도 분석이 가능하여 단시간 분석으로 수행할 수 있다.

㉞ 분석기기 및 분석조건

○ Instrument : Shimadzu LCMS-8030

(equiped with LC-30AD pump, SIL-30AC autosampler, CTO-30A column oven, SPD-20A UV-Vis detector and MS 8030 mass spectrometer)

○ Isonization and analyzer type : ESI(electro spray ionization) and Ion trap

○ Column : Kinetex C18 column (100 X 2.1 mm, 2.6 micron)

- Column oven temperature : 40 °C

○ Mobile phase

- Solvent A : Water + 0.1% formic acid

- Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid

- Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	99	1
1	99	1
3	95	5
13	20	80
20	20	80
22	99	1
30	99	1

- Flow rate : 0.2 ml/min
- Injection volume : 10 μ l
- MS Analytical conditions
 - DL temperature : 250 $^{\circ}$ C
 - Heat block temperature : 400 $^{\circ}$ C
 - Drying gas flow : 15.0 L/min
 - Nebulizing gas flow : 3.0 L/min
 - Collision Energy : -10 V

㉞ 정량용 SIM 이온

표 40에서는 glucosinolates 각각의 분자량과 desulfoglucosinoaltes 상태의 분자량, positive ion 및 negative ion 값을 나타낸다. 이 값을 기본으로 하여 십자화과 종류에 따른 glucosinolates 성분을 정량하였다.

표 40. 정량용 SIM 이온

NO.	Glucosinolates	분자량(M)	Desulfo	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	progoitrin	388	309	310	308
2	glucoraphanin	436	357	358	356
3	sinigrin	358	279	280	278
4	glucoalyssin	450	371	372	370
5	gluconapoleiferin	402	323	324	322
6	gluconapin	372	293	294	292
7	4-hydroxyglucobrassicin	463	384	385	383
8	glucobrassicinapin	386	307	308	306
9	glucoerucin	418	339	340	338
10	glucobrassicin	447	368	369	367
11	4-methylglucobrassicin	477	398	399	397
12	glucoberterion	434	355	356	354
13	gluconastutrin	422	343	344	342
14	neoglucobrassicin	477	398	399	397
15	epiprogoitrin	388	309	310	308
16	glucotropaeolin	408	329	330	328
17	glucoiberin	422	343	344	342
18	glucocheirolin	438	359	360	358
19	glucobrabin	438	359	360	358
20	glucosquerrin	448	369	370	368
21	glucohesperin	464	385	386	384
22	glucosinabin	424	345	346	344
23	glucoepigoitrin	129	50	51	49

㉔ Sinigrin 및 시료 분석 결과

Neutrol loss scan으로 분석한 sinigrin 및 십자화과 채소를 SIM 방법으로 다시 분석하여 glucosinolates 성분을 정량하였다[그림 157, 158]. Sinigrin과 배추, 양배추, 무, 브로콜리 시료 각각의 glucosinolates 분자이온을 선택적으로 확인할 수 있었다[그림 159-162]. 특히, 양배추의 경우 3, 4번이 TIC 상에서는 하나의 peak처럼 보이지만 실제로는 sinigrin (m/z 280)과 glucoraphanin (m/z 358)이 겹쳐있는 것을 확인하였다[그림 160].

■ Sinigrin 분석 결과

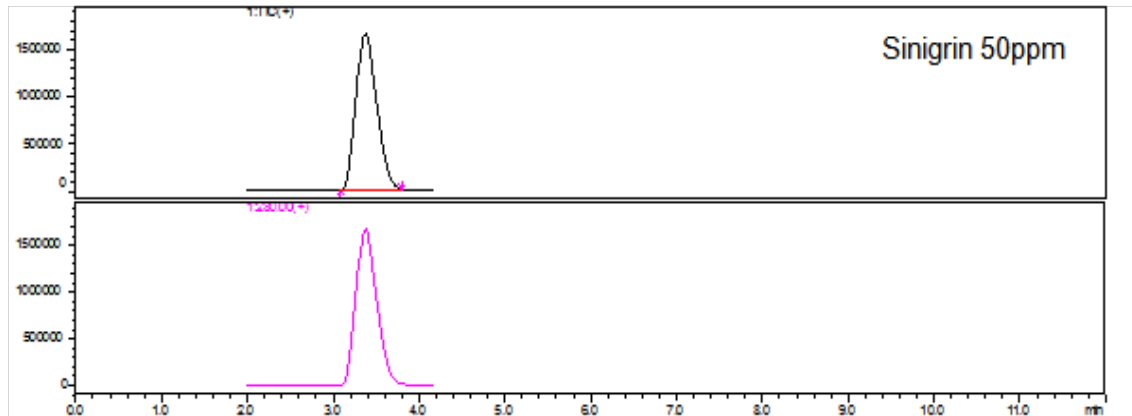


그림 157. Sinigrin 분석 결과 크로마토그램

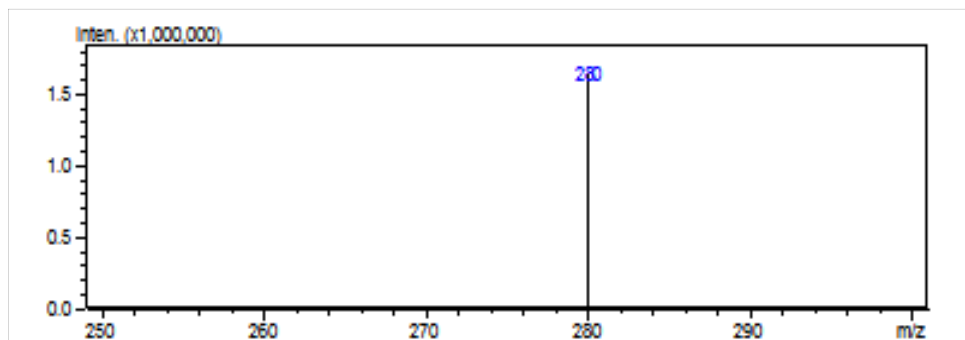


그림 158. Sinigrin MS spectrum

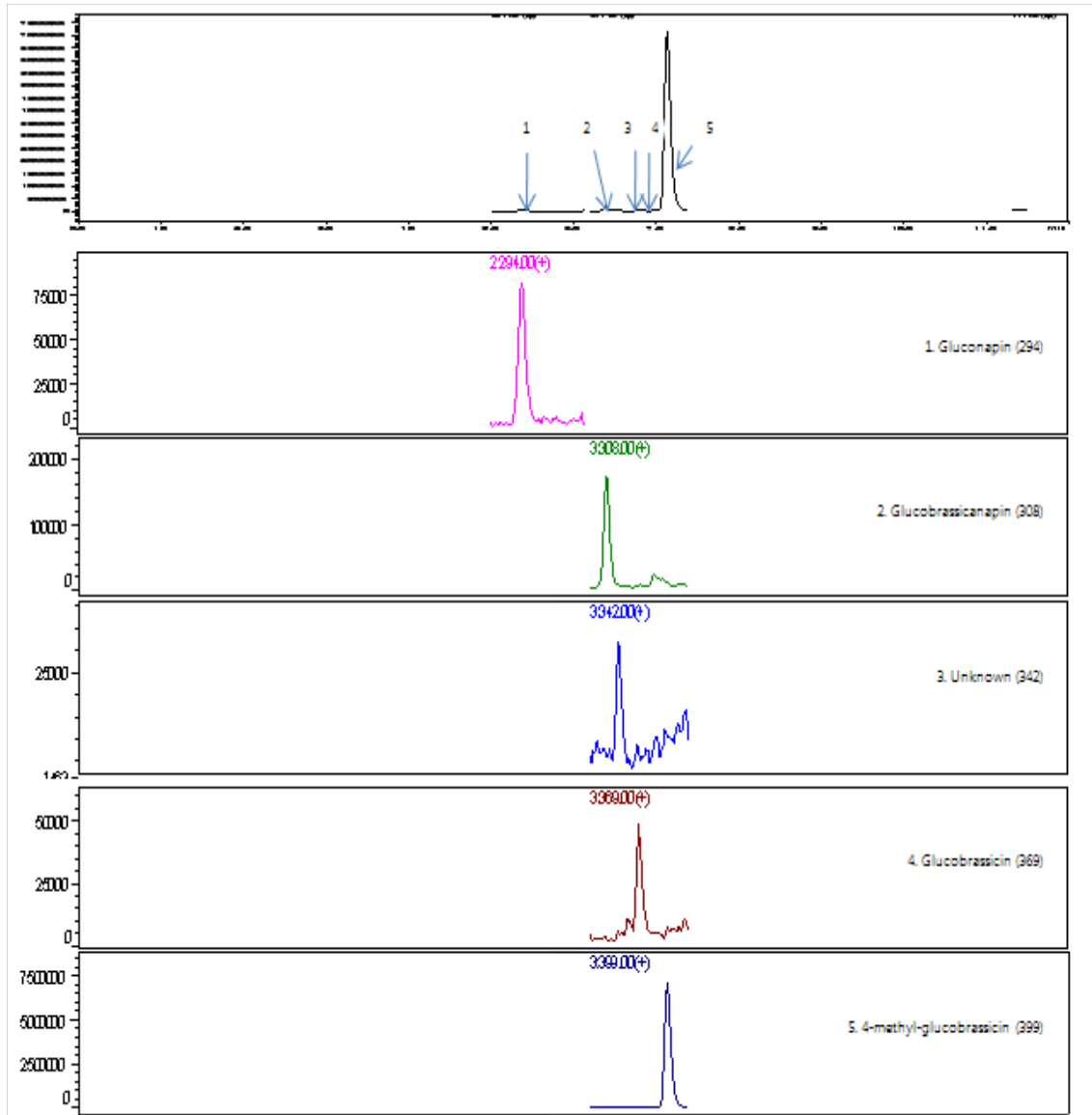


그림 159. 배추 시료 분석 결과 크로마토그램

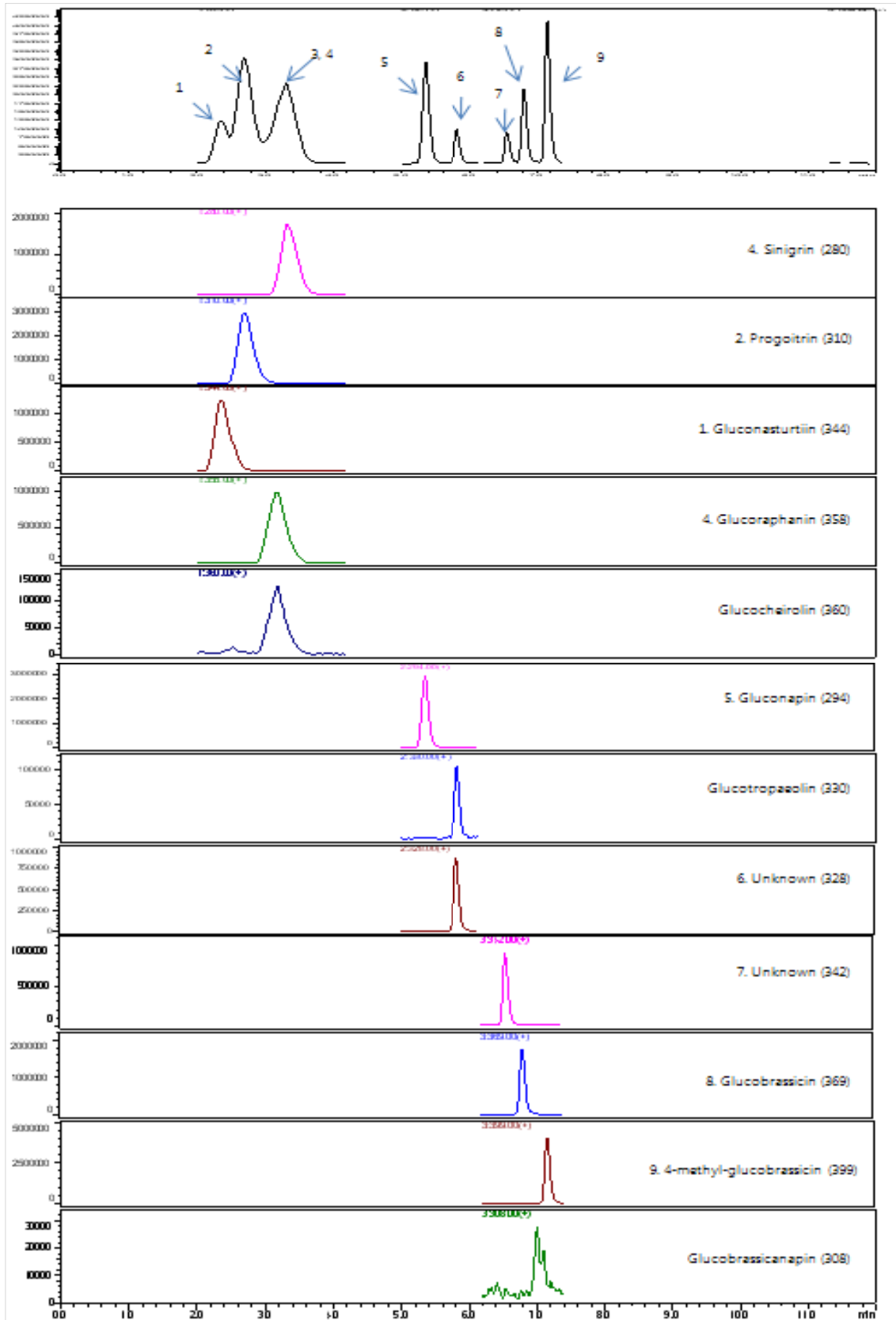


그림 160. 양배추 시료 분석 결과

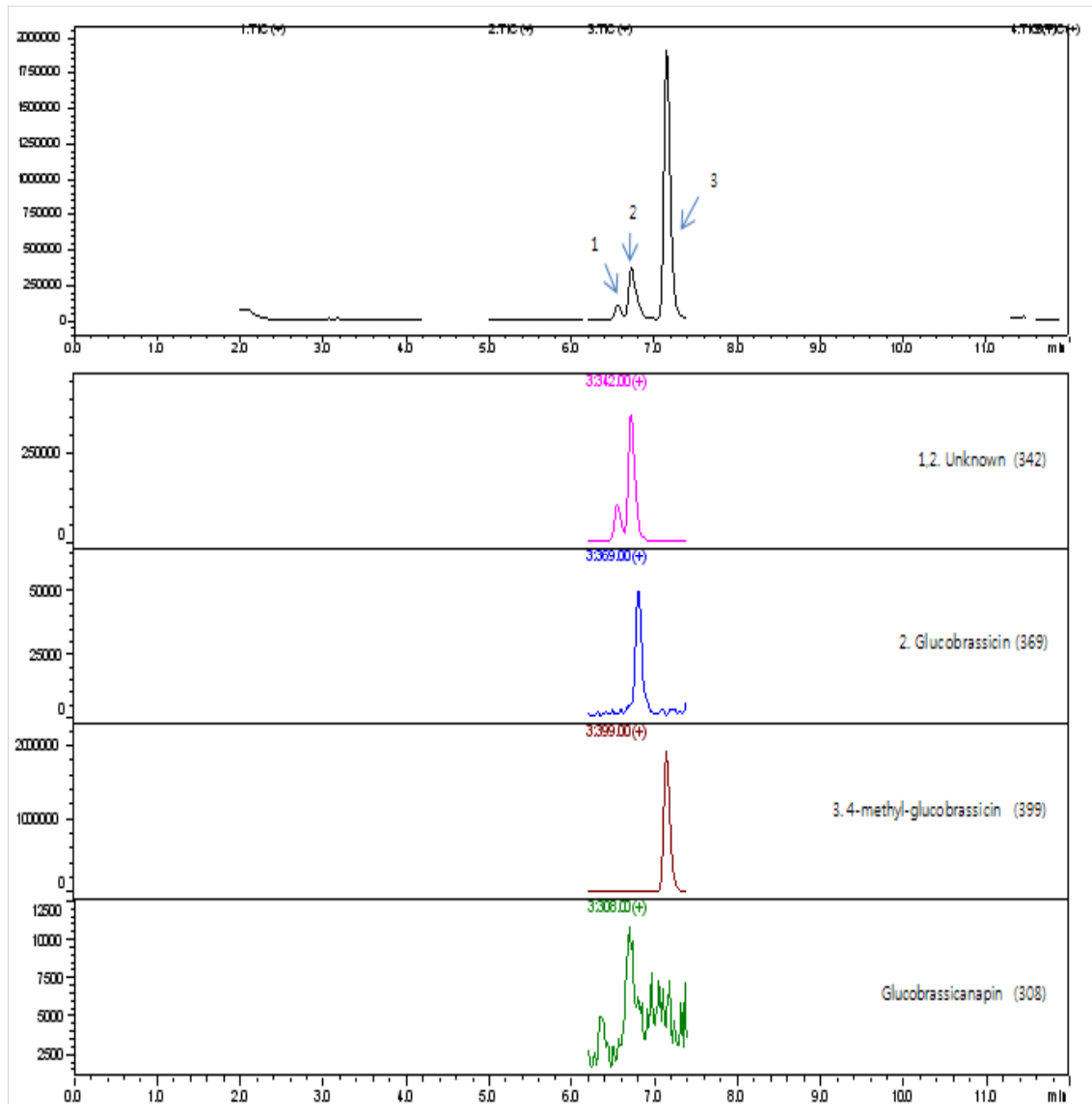


그림 161. 무 시료 분석 결과 크로마토그램

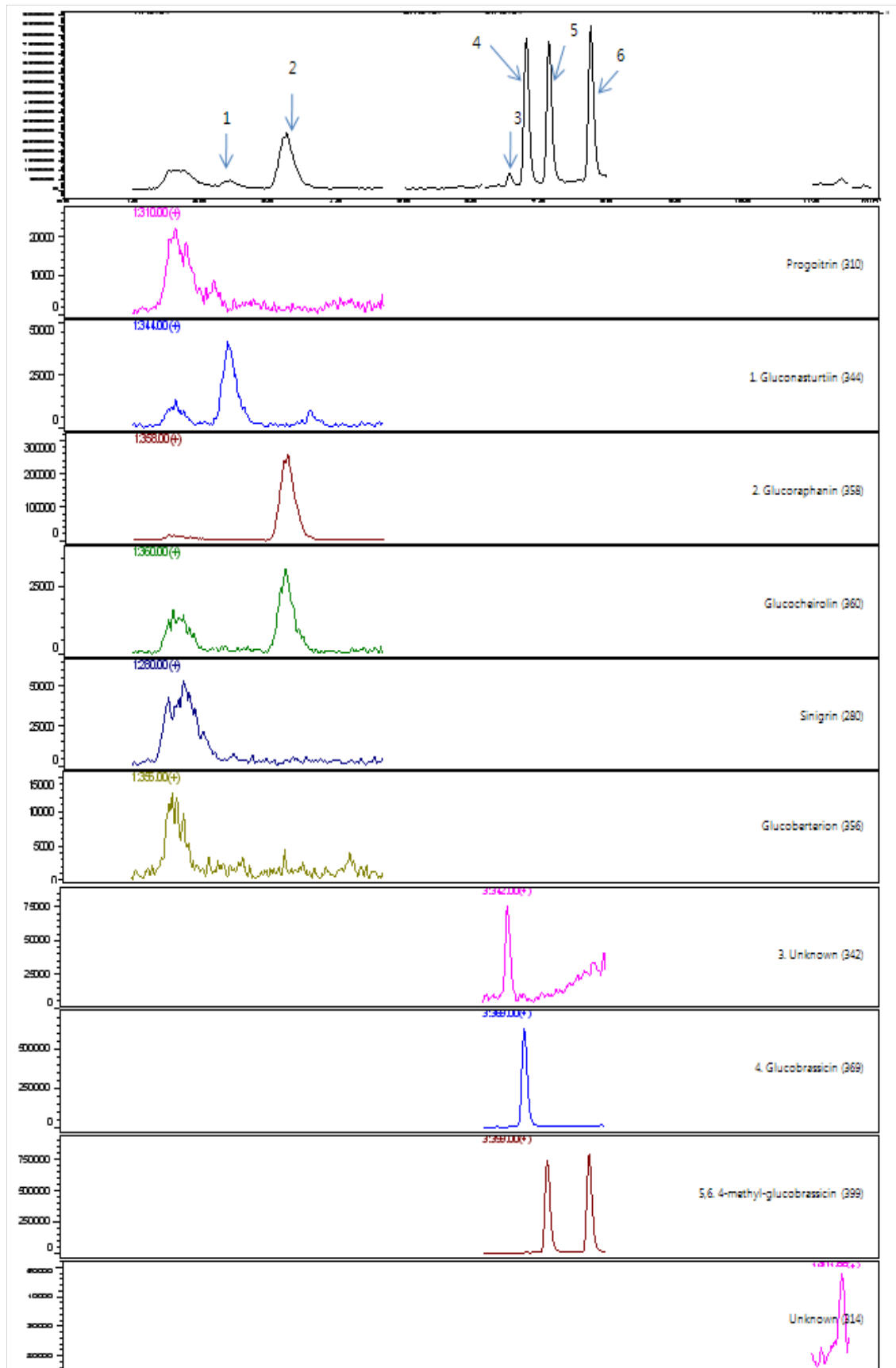


그림 162. 브로콜리 시료 분석 결과 크로마토그램

라. 포도의 항암/항산화성분인 resveratrol과 유기산 성분의 신속분석기술 개발

(1) 포도의 resveratrol 성분 분석 기술 개발

(가) Resveratrol

Resveratrol(*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene)은 폴리페놀류 화합물의 한 가지로 stilbenoid의 대표적인 물질이며 식물의 항진균물질인 phytoalexin의 일종이다. 1940년에 white bellebore (*Veratrum grandiflorum*)이라는 서양 약초에서 처음 분리되었다. 주로 마디풀과, 백합과, 소나무과, 참나무과, 콩과, 뽕나무과, 포도나무과 등 많은 식물에 함유되어 있다. Resveratrol은 곰팡이의 감염이나 자외선 조사, 변온 등의 스트레스에 대한 반응으로 합성이 촉진된다. 주로 항산화작용, 소염작용, 혈소판 응집 억제, 세포분열 억제 등 다양한 생물학적 활성을 가지는 것으로 알려져 있다.

Resveratrol은 stilbene의 한 종류로서 *trans*-resveratrol과 *cis*-resveratrol의 두 가지 이성질체가 있다[그림 163]. 그 중 *trans*-resveratrol이 *cis*-형보다 안정하며 생리활성효과를 나타내는 것으로 알려져 있고, 자외선을 조사하면 *cis*-resveratrol로 바뀐다.

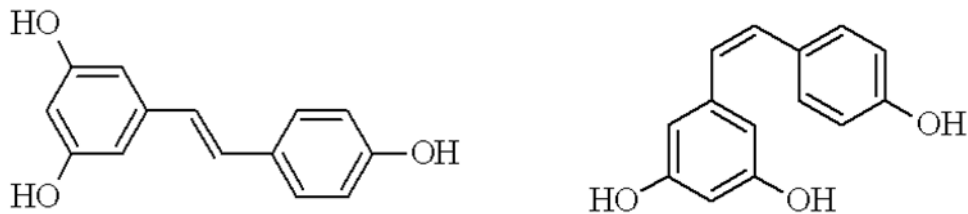


그림 163. *trans*-resveratrol과 *cis*-resveratrol의 구조

Resveratrol은 항암 및 강력한 항산화, 항염증 작용을 하며 혈청 콜레스테롤을 낮춰주는 역할을 한다. 이 외에도 항바이러스, 신경세포 보호 작용, 항노화 및 수명을 연장시키는 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다. 그리고 “French paradox”라고 하여 남부 프랑스 사람들이 미국인들보다 고지방 식품을 많이 섭취하고 운동량은 적고 흡연율이 높은데도 심장 질환의 발병률이 더 낮게 나타났는데, 그 이유가 평상시 즐겨 마시는 와인의 resveratrol 성분이 심혈관 질환의 위험을 감소시키기 때문이었다. 그러나 하루 권장되는 resveratrol 함량은 150 mg 정도로 일반 레드와인 1잔(150 mL)에 0.3-1.0 mg 정도 들어있는 것을 감안하면 15잔 이상을 마셔야하므로 오히려 알코올 섭취에 의한 부작용이 더 커질 수 있다. 그 밖에 resveratrol의 효능에 대한 연구로 관상동맥 질환 방지 효과, 성인병 예방효과가 알려져 있고, *in vivo* 연구에서 *trans*-resveratrol은 테스토스테론과 정자 생성을 증가하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.

일반적으로 resveratrol 함량은 포도 와인에 가장 많은 것으로 알려져 있다. 그러나 resveratrol은 포도송이 가지나 껍질에 주로 존재하기 때문에 식품에 포도 껍질이 얼마나 함유되어 있는지에 따라 그 함량이 다르다. 예를 들어 화이트 와인의 경우 레드와인보다 resveratrol 함량이 적은데 그 이유는 청포도에 resveratrol이 적게 들어있기 때문이 아니라 껍질을 벗기고 화이트 와인을 만들기 때문이다. 또한 주스나 와인에 들어있는

resveratrol은 연도나 지역, 포도의 품종에 따라 함량이 다르다.

최근에는 포도 이외에 오디, 뽕잎 등 다양한 작물에서 resveratrol의 함량을 연구하고 있는데, 오디는 100 g당 78 mg, 뽕잎은 100 g당 102 µg에서 359 µg으로 채취시기별, 품종별로 그 함량이 다르게 나타났다.

(나) Resveratrol 분석법 확립

Resveratrol은 주로 HPLC를 이용해 분석하는데 자외선검출기(UV)와 광다이오드검출기(PDA), 형광검출기(FLD), 질량분석기(MS) 등 다양한 검출기 사용이 가능하다. 일반적으로 resveratrol은 *trans*형과 *cis*형으로 나뉘지는데, *trans*형은 UV 306 nm, *cis*형은 286 nm의 파장에서 검출된다. 그러나 표준품은 *trans*-resveratrol만 판매되고 있어 *cis*형을 함께 분석할 때 UV 광조사를 통해 함께 분석하기도 한다.

HPLC와 LC-MS를 이용한 분석기술 이외에도 GC-MS를 이용하여 *trans*-, *cis*-resveratrol의 분석이 가능하다. GC-MS 분석은 선택성과 특이성이 좋지만 유도체화 과정을 거쳐야 하여 번거롭고 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 또한 injector, column, ion source 온도가 250~300 °C로 높아 시료의 부분적인 isomerization 또는 degradation이 발생하여 정량분석이 어려워질 가능성이 있다.

본 연구실에서는 resveratrol에 대한 다양한 분석방법 중 HPLC-UV, UHPLC-MS/MS를 이용하여 분석조건을 확립하였다.

① Resveratrol 표준용액의 제조

trans-Resveratrol (Sigma, USA) 표준품을 5 mg 칭량하여 methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 표준 혼합 용액을 80% methanol로 단계적으로 희석하여 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 µl씩 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

② Resveratrol 분석을 위한 HPLC 기기조건 확립

※ 일반적으로 기기분석 조건을 확립하기 위해서는 컬럼, 이동상, gradient elution 등 peak 분리능에 영향을 주는 다양한 요소들을 고려해야 한다. 본 연구실에서는 기존에 많은 문헌조사를 통해 가장 많이 사용되면서도 신속 분석이 가능한 방법을 적용하여 resveratrol의 분석 조건을 확립하였다.

최근 땅콩나물의 resveratrol 함량을 분석한 연구들 중에서 Kang 등(2010)은 30-90%로 methanol 함량을 달리하여 18분 동안 254nm의 파장에서 분석하는 방법을 사용하였다. Kang의 연구는 주로 Wang 등(2005)의 방법을 일부 변경한 것으로 Wang의 경우 methanol함량을 20%에서 80%로 변경하여 15분까지 검출하였다. 그리고 파장은 307nm를 사용하였다. Kang과 Wang 등의 분석조건이 20분 이내로 짧게 분석이 가능한 것 같지만 gradient elution 설정 시 80-90%로 methanol 비율을 높이고 나서 다시 처음 농도로 낮추고, 안정화 시켜주는 시간이 필요하다. 그리고 땅콩나물의 경우 다른 물질이 많이 포함되어 있어서 너무 짧은 시간에 분석할 경우 peak가 겹쳐 정량분석이 어려울 수

있다.

본 연구실에서는 다양한 문헌들의 resveratrol 분석 조건을 바탕으로 resveratrol 표준 물질과 땅콩나물 시료에 맞춰 최적 분리 조건을 확립할 수 있도록 하였다.

㉔ *trans*-Resveratrol의 UV 파장 선택

Resveratrol에 대한 분석 파장은 논문별로 상이한데 주로 254 nm보다 306~309 nm 범위에서 많이 분석되고 있다. *trans*-resveratrol의 최대 흡광 파장을 알아보기 위해 diode array detector를 이용하여 분석하였다[그림 164]. DAD spectrum 결과를 보면 *trans*-resveratrol의 최대 흡광 파장이 306 nm에서 가장 높은 것을 확인하였다. 이는 다른 문헌에서 사용한 파장과 비슷한 결과를 나타내었고, 다른 장비의 photodiode array detector로 확인한 결과와도 동일한 파장을 나타냈다. 따라서 *trans*-resveratrol의 UV 파장은 306nm로 선택하여 분석하였다.

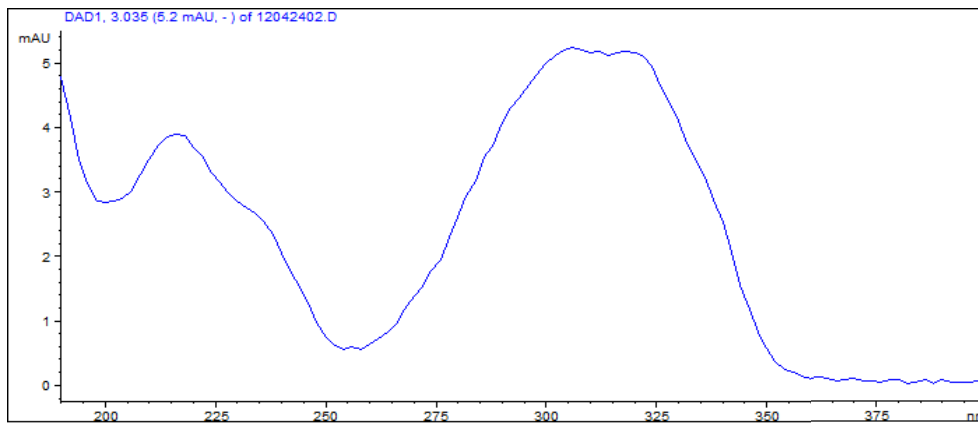


그림 164. *trans*-Resveratrol의 DAD spectrum 결과

㉕ 컬럼 및 gradient elution 조건에 따른 peak 변화 비교

■ Kang 등(2010)의 방법

Kang 등(2010)에서 분석한 방법은 15분 동안 30%에서 90%로 methanol 함량을 높이는 것인데 안정화 시간도 전혀 없이 direct로 이동상 비율을 높이면 시료를 연속분석할 경우 이동상이 충분히 안정되지 않아 retention time이 밀리거나 충분히 빠져나오지 못한 sample이 다음 분석에 영향을 줄 수 있다. 그래서 처음과 마지막에 초기 비율로 안정화 시키는 시간을 추가하여 gradient elution을 설정하였다[표 41, 42].

위 조건하에서 resveratrol 표준용액 1 pm을 분석한 결과 retention time 15.2분에서 peak를 확인할 수 있었다[그림 165, 166]. 땅콩나물 추출물의 분석 결과에서도 15.2분에 resveratrol peak가 나타났으나 전반적으로 unknown peak가 많이 겹쳐있어 정량하기에는 적합하지 않았다. Baseline이 위로 올라간 것은 30%에서 70%로 methanol 비율이 높아지는 gradient 조건 때문이다.

표 41. 기기 분석 조건

분석기기	Shimadzu HPLC 10ADvp
검출기 파장	UV 306nm
컬럼	Shiseido C18 column (250 × 4.6 mm, 5 micron)
이동상 A	Methanol + 0.1% formic acid
이동상 B	DW (증류수)
유속	0.8 ml/min
주입량	20 μ l

표 42. Gradient elution

Time (min)	% A	% B
0	30	70
3	30	70
18	70	30
23	70	30
30	30	70
40	30	70

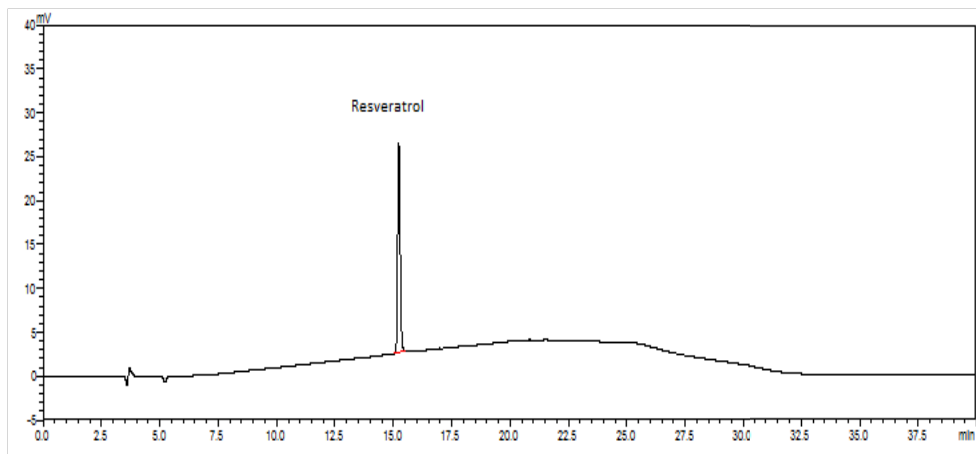


그림 165. Kang(2010)방법에 의한 resveratrol 표준용액 분석 결과 크로마토그램

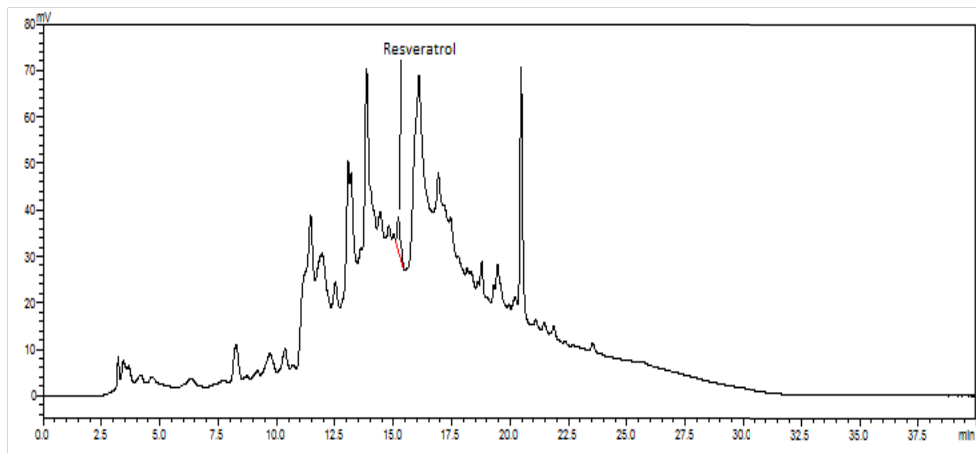


그림 166. Kang(2010)방법에 의한 땅콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램

▣ Rudolf 등(2005)의 방법

Rudolf 등(2005)은 땅콩에서 resveratrol 함량을 분석하였는데 gradient steepness, 컬럼 오븐 온도, 분석 시간에 따른 시료 분석 결과를 보여주고 있다. 그 중 오븐 온도가 40℃와 60℃일 때의 차이는 거의 없었고, 5%에서 77%로 acetonitrile의 비율이 증가되는 시간이 15분, 30분, 45분, 60분으로 길어질수록 (gradient steepness값은 낮아짐) resveratrol 분리가 더 잘 되는 것으로 나타났다.

Rudolf 방법에서 5%-77% acetonitrile로 증가하는 시간 중 45분 분석 결과를 참고로 하여 gradient elution을 변경하고[표 43, 44], 표준물질과 시료를 분석해보았다[그림 167, 168].

표 43. 기기 분석 조건

분석기기	Shimadzu HPLC 10ADvp
검출기 파장	UV 306nm
컬럼	Shiseido C18 column (250 X 4.6 mm, 5 micron)
이동상 A	Acetonitrile
이동상 B	DW + 0.1% acetic acid
유속	1.0 ml/min
주입량	20 μ l

표 44. Gradient elution

Time	% A	% B
0	5	95
45	77	23
50	77	23
57	5	95
70	5	95

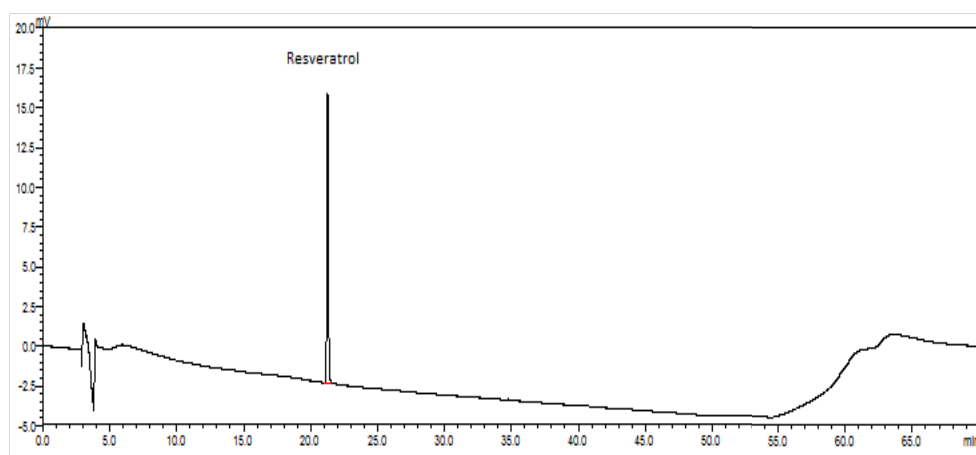


그림 167. Rudolf(2005) 방법에 의한 resveratrol 표준용액 분석 결과 크로마토그램

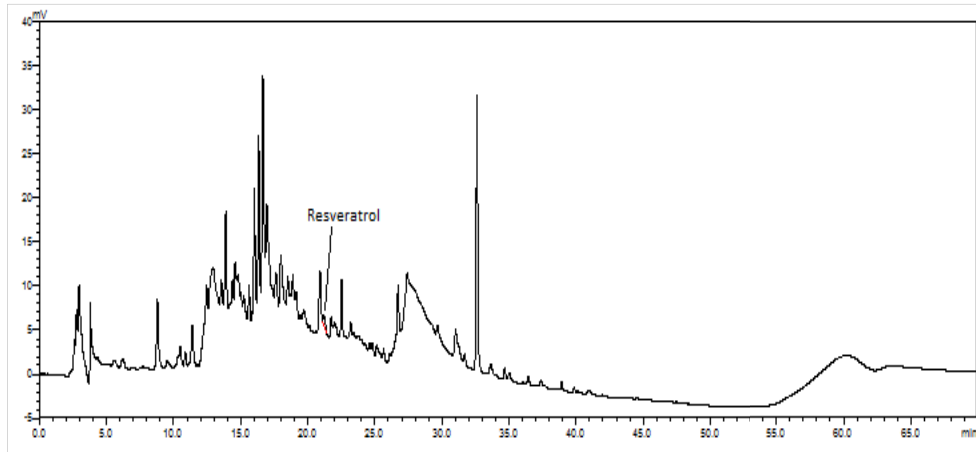


그림 168. Rudolf(2005) 방법에 의한 땅콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램

■ Pae 등(2011)의 방법

Pae 등(2011)에서 분석한 방법을 그대로 적용하여 40% acetonitrile을 isocratic elution (등용매 분리)로 10분 동안 분석해보았다[표 45]. *trans*-resveratrol 1 ppm을 분석한 결과 3.014분에 나타나는 것을 확인하였다[그림 169, 170].

표 45. 기기 분석 조건

분석기기	Agilent HP1100 series
검출기 파장	UV 308nm
컬럼	Wako C18 column (150 × 4.6 mm, 5 micron)
이동상 A	DW (증류수)
이동상 B	Acetonitrile
유속	1.0 ml/min
주입량	20 μ l

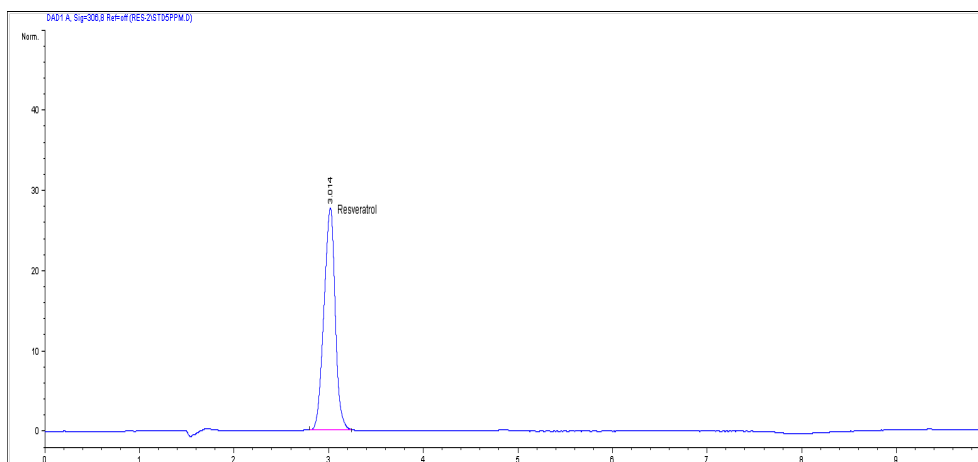


그림 169. Pae(2011) 방법에 의한 resveratrol 표준용액 분석 결과 크로마토그램

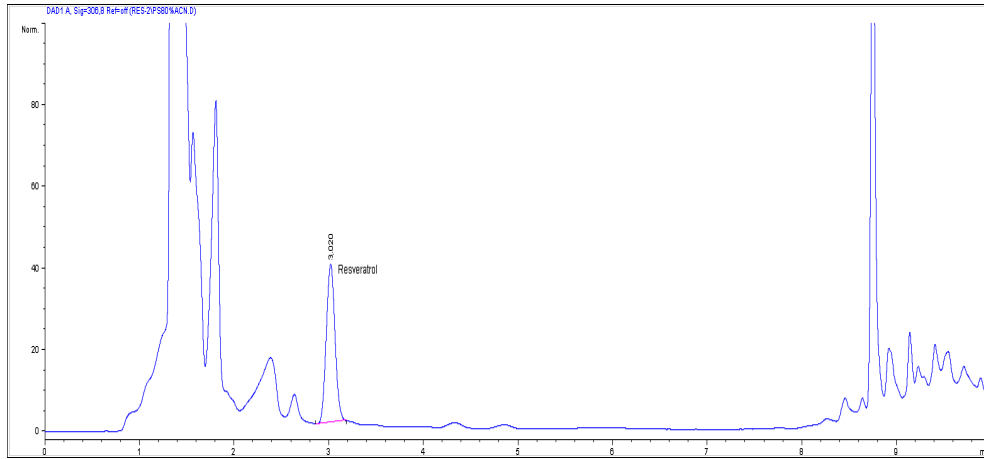


그림 170. Pae(2011) 방법에 의한 땅콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램

■ 기존 분석 방법 modify

본 연구실에서는 isocratic elution을 gradient elution으로 변경하였다[표 46, 47]. 그 이유는 gradient elution에서 resveratrol peak 이후의 시간은 clean up 단계로 유기용매 비율을 높여 resveratrol peak을 제외한 다른 unknown 물질들이 빠져나갈 수 있도록 하여 다음 시료에 영향을 주지 않기 위함이다[그림 171, 172].

표 46. 기기 분석 조건

분석기기	Shimadzu HPLC 10ADvp
검출기 파장	UV 306nm
컬럼	Shiseido C18 column (250 × 4.6 mm, 5 micron)
이동상 A	DW
이동상 B	Acetonitrile
유속	1.0 ml/min
주입량	20 μ l

표 47. Gradient elution

Time	% A	% B
0	60	40
5	60	40
7	20	80
12	20	80
14	60	40
20	60	40

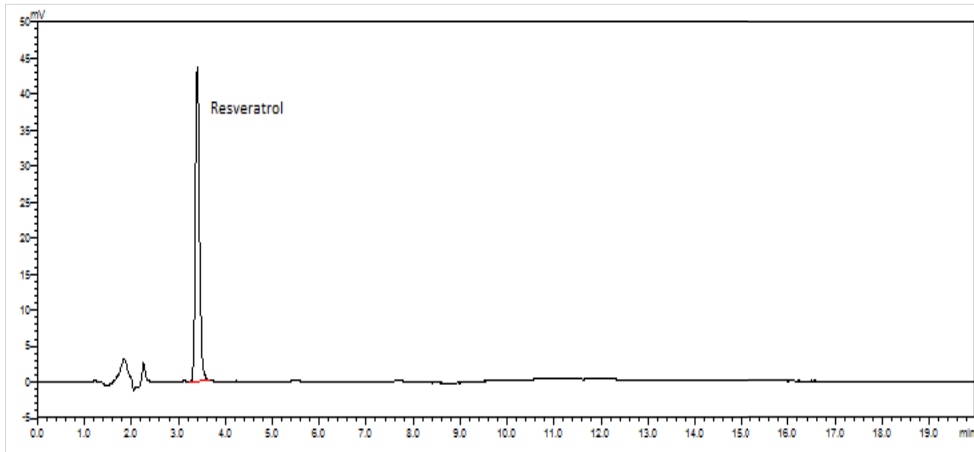


그림 171. 변경된 방법에 의한 resveratrol 표준용액 분석 결과 크로마토그램.

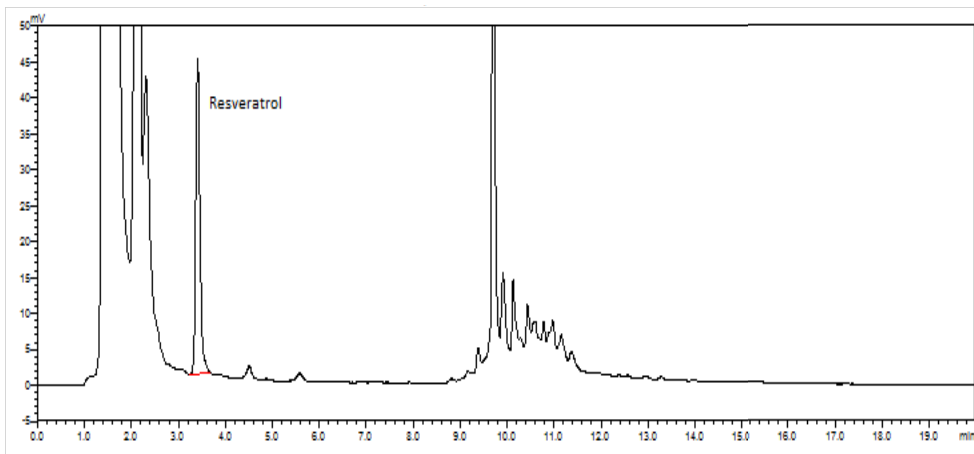


그림 172. 변경된 방법에 의한 땅콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램.

㉔ 결론

Resveratrol 분석을 위한 HPLC 기기조건을 확립하기 위해 Kang, Rudolf, Pae 방법을 비교 검토한 결과 Pae의 isocratic elution을 gradient elution으로 변경한 방법을 최종 분석조건으로 확립하였다. 최종 확립된 분석 방법을 땅콩나물 시료에 적용해보았을 때, resveratrol 표준물질이 3.4분대에 나타나고 땅콩나물 시료에서도 다른 방해물질 없이 정량분석이 가능한 것을 확인하였다.

③ 시료 추출 방법의 확립

※ Resveratrol의 함량을 알아보기 위하여 땅콩나물 시료를 기준으로 추출 조건을 확립하였다. 기기 분석 조건을 확립하면서 동시에 다양한 추출 방법을 비교 분석하여 실험해보았는데, 대부분 80% methanol 추출 방법을 사용하였다.

Pae 등(2011)은 땅콩 싹나물에 대한 resveratrol 함량을 연구하였는데 80% methanol을 사용하여 25℃에서 1시간 동안 초음파 추출하여 분석하였다. Wang 등(2005)은 Pae와 같은 용매를 사용하였으나 70℃에서 20분 동안 반응시키는 방법을 사용하였다. Lee 등

(2003)은 땅콩 품종별 resveratrol 추출 조건을 확립하였는데 100% EtOH에서는 resveratrol이 검출되지 않았고, 100% MeOH < 80% EtOH < 80% MeOH 순으로 resveratrol 함량이 높게 나타났다. 그리고 80% EtOH와 80% MeOH 추출물의 함량은 각각 0.22 ug/g, 0.25 ug/g으로 차이가 거의 없었다. 그 이외에도 대부분 70~100% ethanol 또는 methanol을 추출용매로 많이 사용하고 있었다.

본 연구실에서는 ethanol 보다는 이동상과 조성이 같은 methanol을 이용한 추출방법을 확립하고 그 결과를 비교해보았다. 그리고 S.B. Pae et al. (2011)의 추출방법을 일부 적용하여 포도 및 땅콩나물의 resveratrol 분석을 위한 최적 추출 조건을 확립하였다.

※ 땅콩나물 시료는 이삭바이오에서 제공받아 믹서로 갈아 -20℃에서 얼린 후 동결 건조하여 건조 분말을 시료로 사용하였다.

㉔ 80% methanol 추출 방법 비교

■ Wang 등(2005)의 방법

땅콩나물은 각 부위별(땅콩, 잎, 줄기, 뿌리)로 나누어 동결건조한 후 사용하였다. Wang 등의 추출 방법을 그대로 적용하기에는 실제 땅콩나물의 부위 중에서 뿌리는 밀도가 작아 80% methanol 4 mL로 충분히 혼합하기에 어려움이 있었다. 그래서 본 연구실에서 실제 시료에 맞춰 volume을 늘려 추출 방법을 변경해보았다. 변경된 방법은 다음과 같다.

시료 0.2g에 80% methanol 5 mL을 가하고 10초간 혼합하였다. Homogenizer를 이용하여 1분간 마쇄 후 70℃ water bath에서 20분 동안 추출하였다. 추출물은 2,700 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 0.45um syringe filter로 여과하고, HPLC 분석시료로 사용하였다[그림 173].

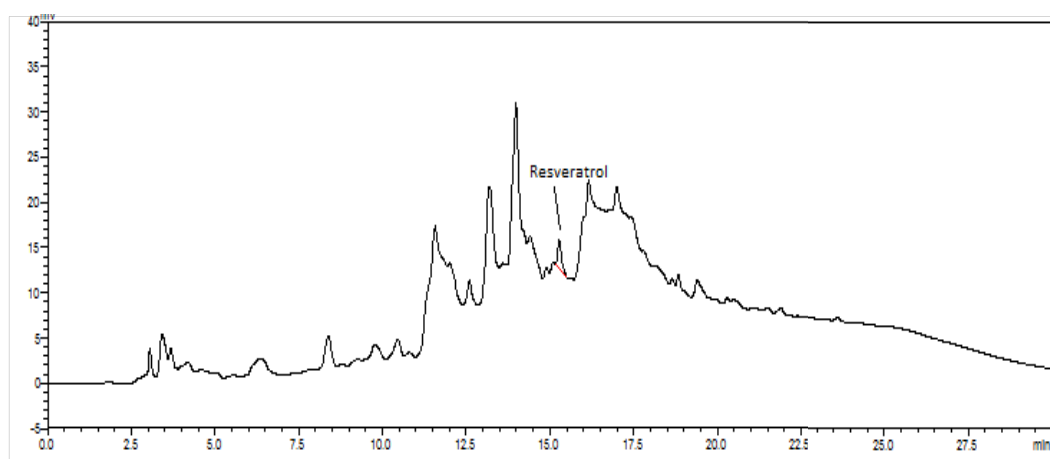


그림 173. Wang(2005) 방법에 의한 땅콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램.

■ Lee 등(2006), Shin 등(2007)의 방법

Wang의 방법은 시료나 추출용매의 양이 적어 땅콩나물과 포도 시료의 resveratrol 성분을 추출하기 위한 방법으로 적합하지 않았다. 그래서 다른 연구 문헌들 중 Lee와

Shin의 추출 방법을 일부 적용하여 비교 분석해보았다.

I. Lee 등(2006)의 방법: 시료 1g에 80% methanol를 10 mL 가하고 10초 동안 혼합하였다. 70°C에서 60분 동안 추출한 다음 2,700 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 0.2um syringe filter로 여과한 후 HPLC 분석 시료로 사용하였다[그림 174].

II. Shin 등(2006)의 방법: 시료 1g에 80% methanol를 10 mL 가하고 10초 동안 혼합하였다. 상온에서 45분 동안 250 rpm으로 추출한 다음 2,700 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 0.2um syringe filter로 여과한 후 HPLC 분석 시료로 사용하였다[그림 175].

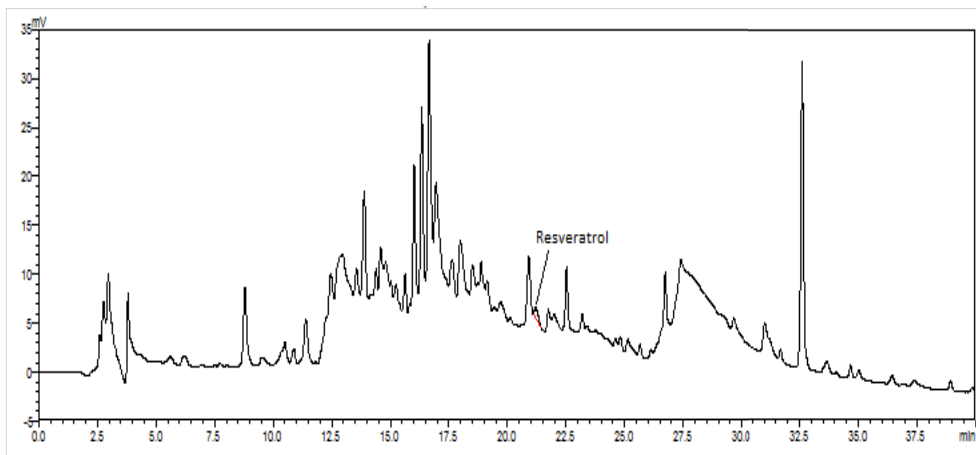


그림 174. Lee(2006) 방법에 의한 땅콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램

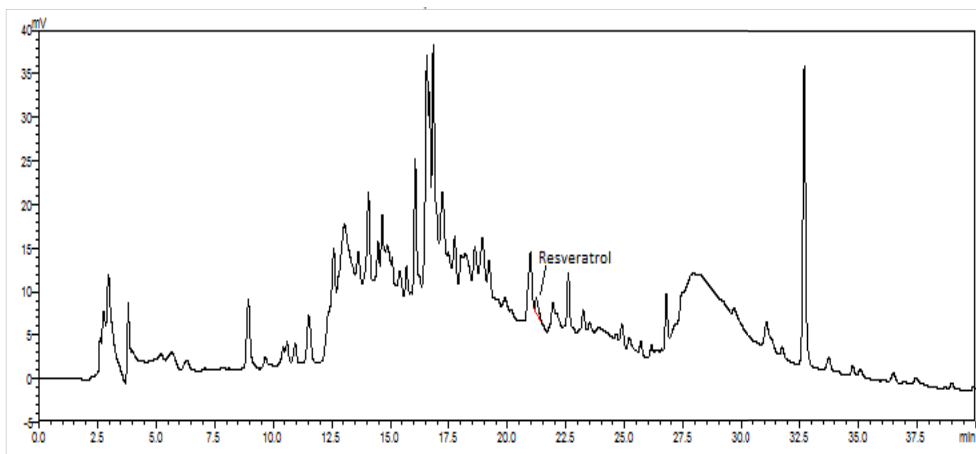


그림 175. Shin(2007) 방법에 의한 땅콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램

땅콩을 상온에서 45분간 추출한 것과 70°C에서 60분간 추출한 것은 결과 크로마토그램의 peak만 봐서는 큰 차이가 없어보였다. 같은 기기 조건에서 추출 방법만 다른데 전반적으로 다른 물질들이 많이 존재하고 resveratrol retention time에 해당하는 peak가 다른 peak와 겹쳐서 shoulder 형태로 나타났다.

■ Pae 등(2011)의 방법

시료 1 g에 80% methanol 10 ml을 넣고 약 10초 동안 vortex하였다. 시료가 담긴 tube를 ultrasonicator에 넣고 25℃에서 1시간 동안 초음파 추출하였다(이때, 30분에 한 번 vortex 해주었다). 추출물의 상층액을 0.45µm PTFE syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다[그림 176].

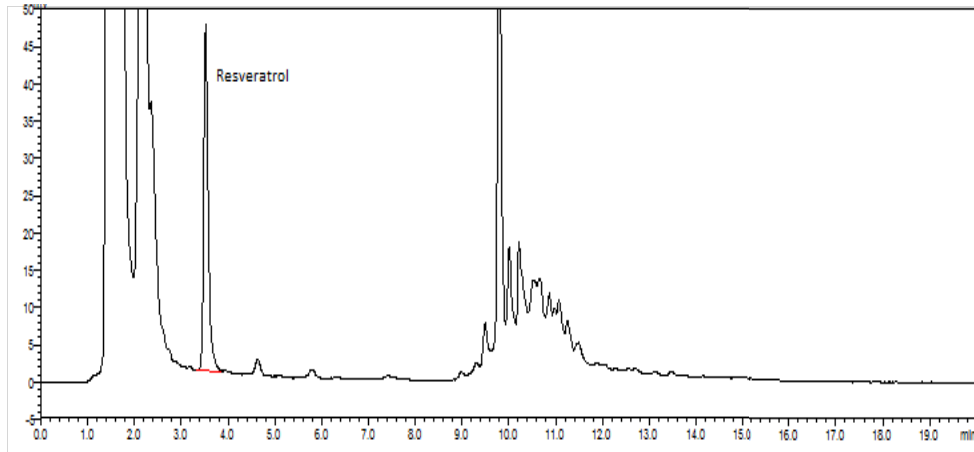


그림 176. Pae(2011)의 방법 80% methanol 추출물의 분석 결과 크로마토그램

㉔ 결론

Wang, Lee, Shin, Pae 등의 추출방법을 비교 검토한 결과 Pae 등(2011)의 방법을 최종 방법으로 결정하였다.

(다) 분석법 검증

※ 위 방법의 유효성을 확인하기 위해 검출한계와 정량한계, 재현성, 직선성 실험을 진행하였다.

① 분석 기기의 검출한계, 정량한계

검출한계(Limit of Detection, LOD) 및 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는 분석기기의 감도를 검증할 수 있는데, 농도별 resveratrol 표준용액을 분석하여 S/N ratio(signal과 noise의 비율)를 구하고, 검출한계는 $S/N > 3\sim 5$ 배, 정량한계는 $S/N > 10$ 배(LOD의 3~5배 이상)로 하였다.

Resveratrol의 검출한계는 2 ng이고, 정량한계는 10 ng이다[표 48].

표 48. Resveratrol의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

	LOD(ng)	LOQ(ng)
Resveratrol	2	10

② 분석의 재현성

분석의 재현성 실험은 일정한 양의 표준품을 7번 이상 반복 주입 분석하여 머무름 시간 (t_R), peak의 면적(Area)의 오차를 조사하는데, 전체적으로 분석기기의 안정성을 알아보기 위해 수행한다. 본 연구에서 설정한 정량한계(LOQ)의 2배에 해당하는 resveratrol 1ppm 농도를(2LOQ) 연속으로 7번 분석한 결과, t_R , area의 반복 분석간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다[표 49].

표 49. Resveratrol의 재현성 실험 결과

Resveratrol 1ppm	1	2	3	4	5	6	7	Average	C.V.(%)
t_R	3.383	3.381	3.378	3.376	3.374	3.372	3.371	3.38	0.13
Area	42737	42090	41527	41785	41701	42287	42436	42080.43	1.03

③ 검량선의 직선성

㉞ 표준용액 제조

Resveratrol 표준품을 5 mg 칭량하여 80% methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 제조하였다. 이 표준 혼합 용액을 단계적으로 희석하여 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1ppm 용액을 만들고, 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 결과를 확인하였다[그림 177].

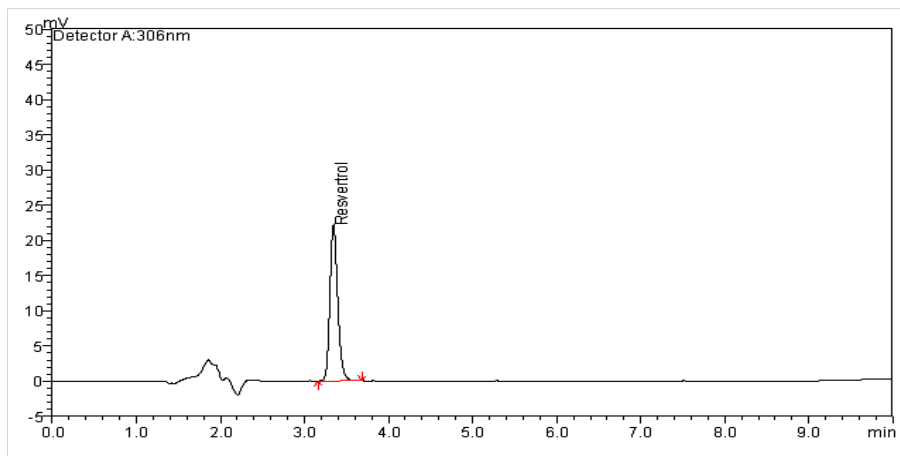


그림 177. Resveratrol 표준용액 (1 ppm) 분석 결과 크로마토그램

㉞ 표준용액(20~500ppm) 검량선의 직선성

Resveratrol 표준용액 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 ppm을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[표 50, 그림 178].

Resveratrol 표준용액을 분석하여 얻은 검량선은 $R^2=0.999$ 이상으로 직선성이 우수함을 확인하였다[표 51].

표 50. Resveratrol 표준용액 농도별 Area 값

#	Conc	Area
1	0.1	4988.6
2	0.5	24511.6
3	1	49192.6
4	2	98775.5
5	5	262706.5
6	10	583314.9
7	20	1150235.9

표 51. Resveratrol 표준용액의 검량선 및 직선성

	Calibration curve	R ²
Resveratrol	$y=1.72173e-005*x+0.167774$	0.999

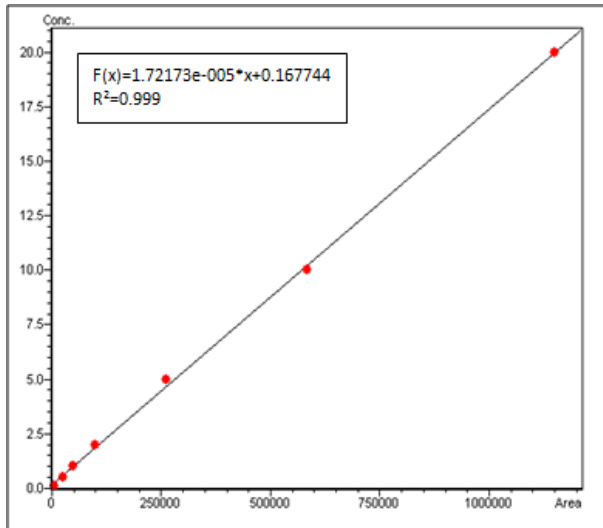


그림 178. Resveratrol 표준용액의 검량선

(라) 작물 시료의 resveratrol 분석 및 결과

※ 확립/검증된 분석법을 이용하여 포도, 땅콩나물의 resveratrol 성분을 분석하였다.

① 시료의 분석 조건

- 분석기기: Shimadzu 10ADvp HPLC (Japan)
- 검출기: UV detector (Wavelength : 306 nm)
- 컬럼: Wako C18 column (150 X 4.6 mm, 5 μm)
- 컬럼 오븐 온도: 35 °C
- 이동상
 - Solvent A : Water
 - Solvent B : Acetonitrile
 - Gradient program

Time(min)	%A	%B
0	60	40
5	60	40
7	20	80
12	20	80
14	60	40
20	60	40

- 유속: 1.0 mL/min
- 주입량: 20 μ l

② 시료 추출 조건

땅콩나물 시료 1 g에 80% methanol 10 ml을 넣고 약 10초 동안 vortex하였다. 시료가 담긴 tube를 ultrasonicator에 넣고 1시간 동안 초음파 추출하였다(이때, 30분에 한번 vortex 해주었다). 추출물의 상층액을 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 모든 시료는 3반복 추출하였다.

③ 시료 분석 결과

㉠ 시료별 resveratrol 함량(ug/g)

땅콩나물의 종류별, 부위별 함량 결과는 표 14와 같다. 시료 종류는 참평, 참원, 미광이 있고, 각 부위로는 상배엽(Epiblast; Ep), 자엽(Cotyledon; Ct), 하배엽(Hypoblast; Hp), 뿌리(Root; Rt)가 있다. 전체 시료 함량은 미광>참평>참원 순으로 resveratrol 함량이 높고, 각 부위별로는 품종마다 다르게 나타났다. 참원은 자엽을 제외한 다른 부위에서 resveratrol의 함량이 나타나지 않은 반면, 미광은 부위별로 resveratrol이 더 많이 함유되어 있었다[표 52].

표 52. 땅콩나물 종류별, 부위별 resveratrol 함량 결과

시료		Resveratrol 함량 (ug/g)	C.V.(%)
CP (참평)	CP-Ep	<0.5	0.
	CP-Ct	1.20	9.3
	CP-Hp	1.06	15.0
	CP-Rt	2.24	16.6
CW (참원)	CW-Ep	0.00	0.00
	CW-Ct	1.82	11.7
	CW-Hp	0.00	0.00
	CW-Rt	0.00	0.00
MK (미광)	MK-Ep	2.56	6.9
	MK-Ct	0.66	1.7
	MK-Hp	3.48	6.1
	MK-Rt	1.67	7.9

㉔ 시료 분석 결과 크로마토그램

땅콩나물의 종류별, 부위별 분석 결과 크로마토그램은 그림 179-190과 같다.

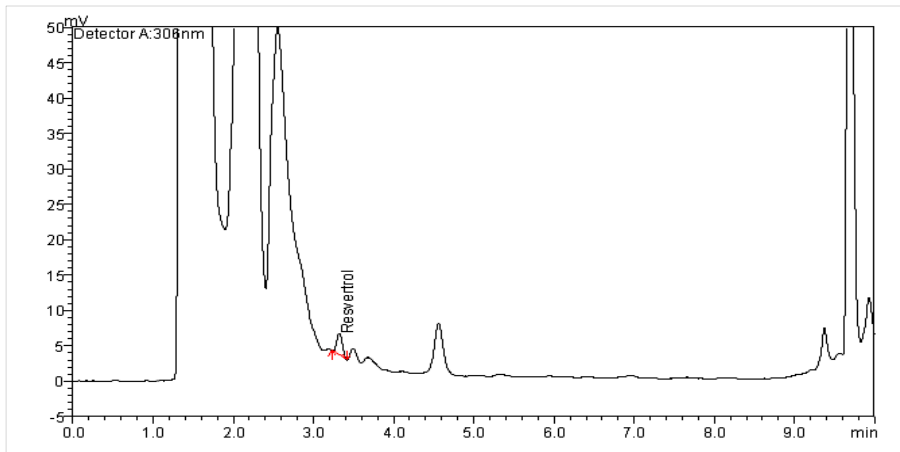


그림 179. 참평 자엽 시료 분석 결과 크로마토그램

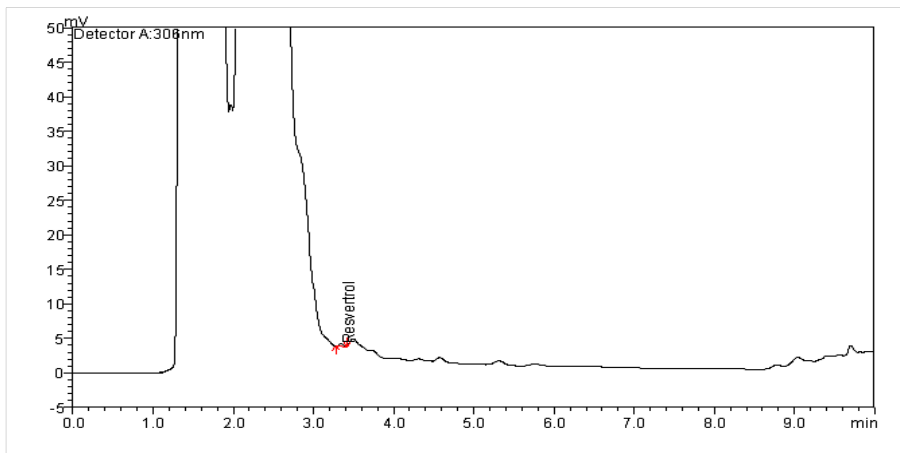


그림 180. 참평 상배엽 시료 분석 결과 크로마토그램

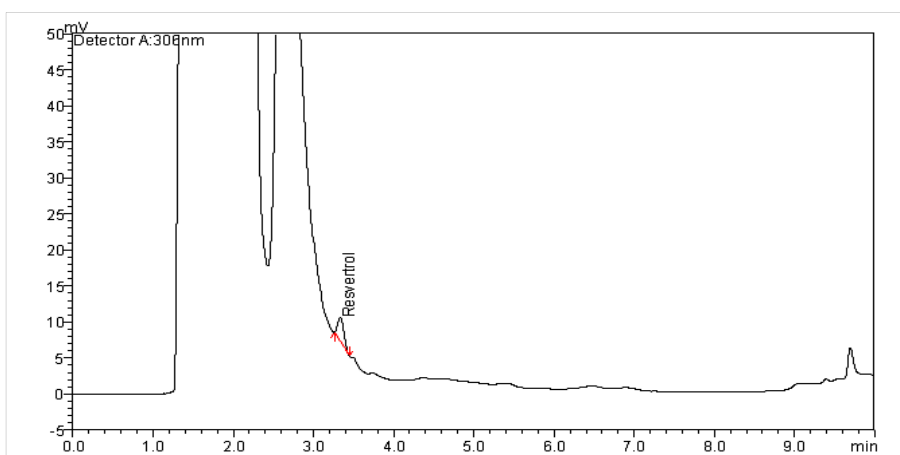


그림 181. 참평 하배엽 시료 분석 결과 크로마토그램

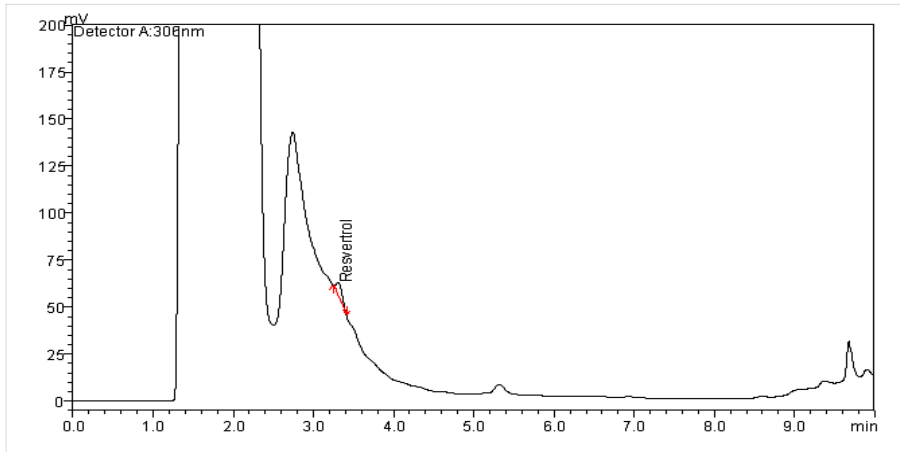


그림 182. 참평 뿌리 시료 분석 결과 크로마토그램

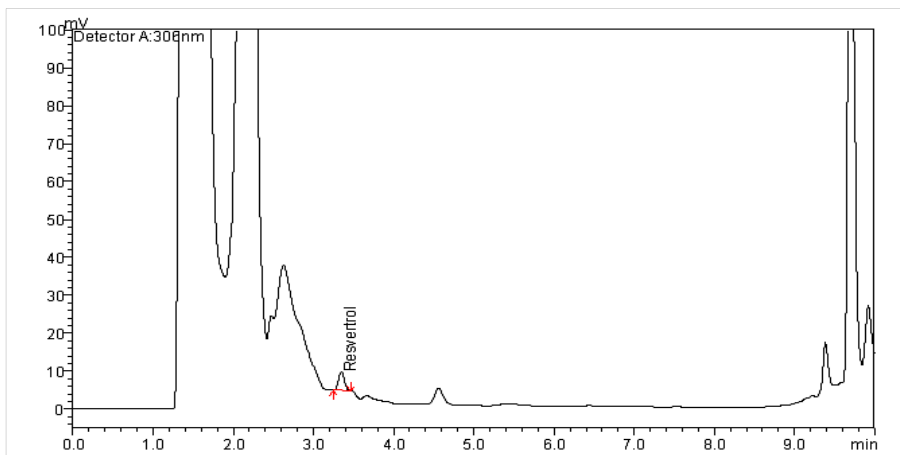


그림 183. 참원 자엽 시료 분석 결과 크로마토그램

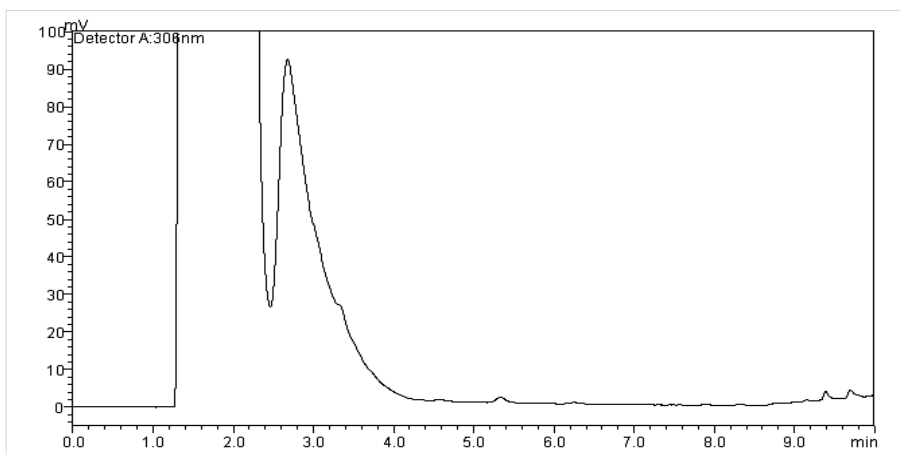


그림 184. 참원 상배엽 시료 분석 결과 크로마토그램

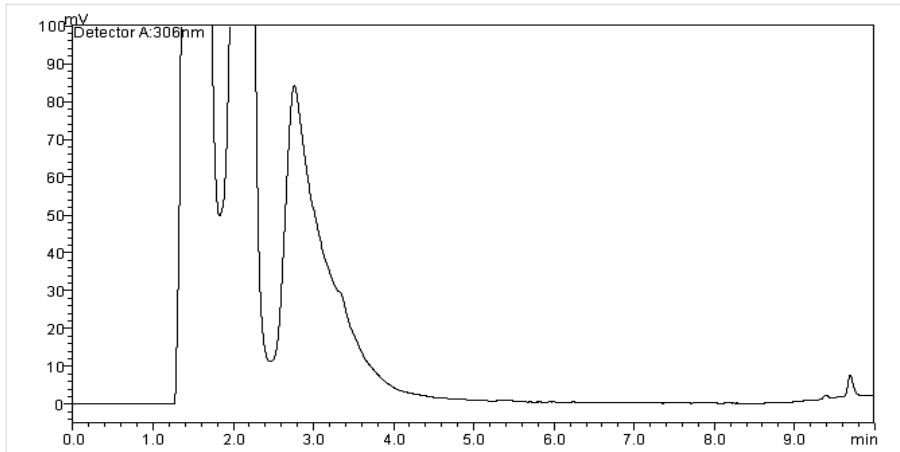


그림 185. 참원 하배엽 시료 분석 결과 크로마토그램

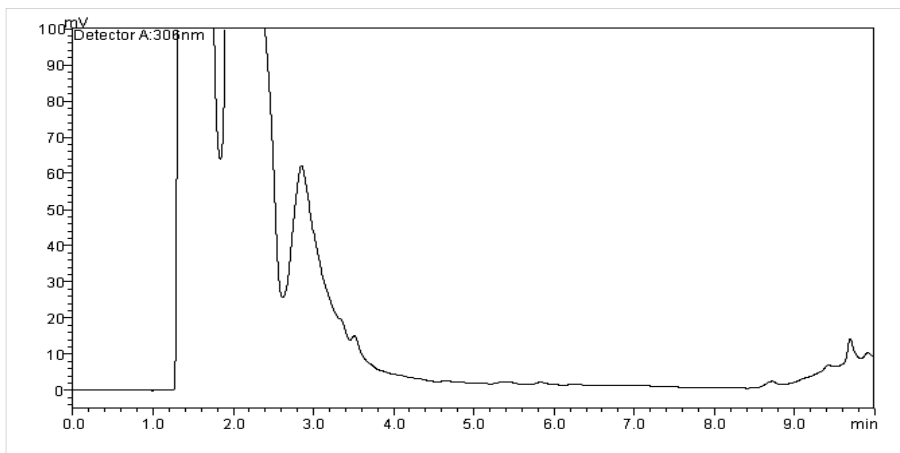


그림 186. 참원 뿌리 시료 분석 결과 크로마토그램

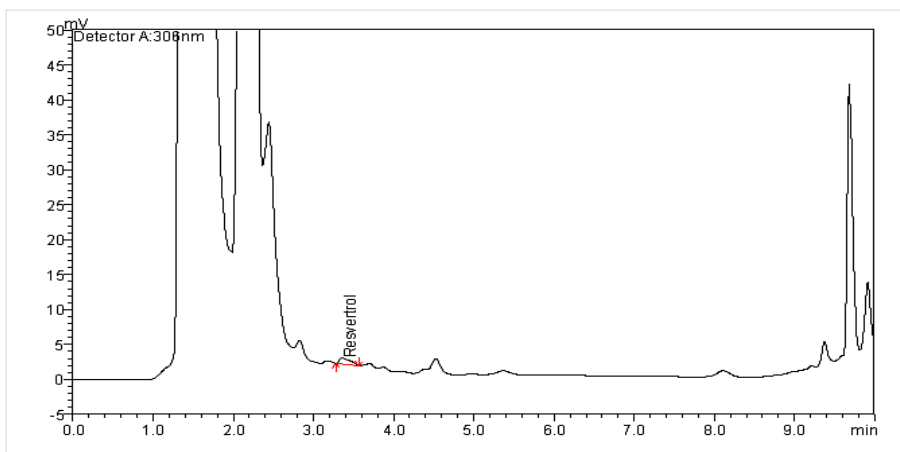


그림 187. 미광 자엽 시료 분석 결과 크로마토그램

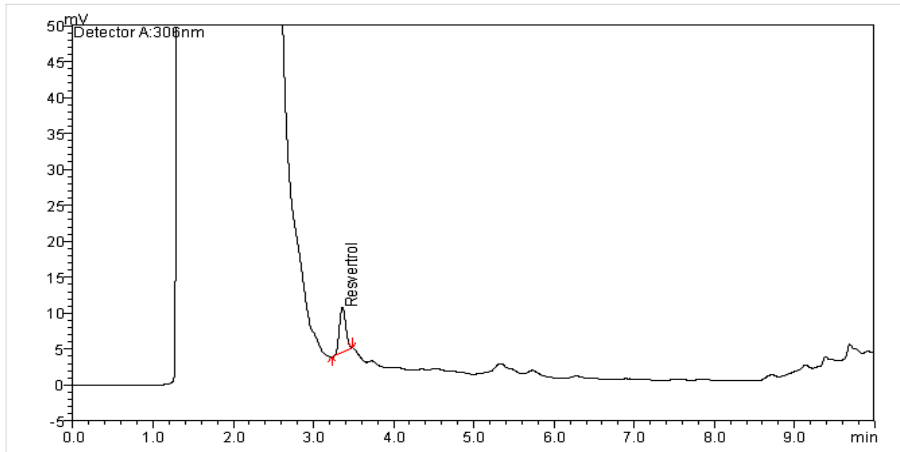


그림 188. 미광 상배엽 시료 분석 결과 크로마토그램

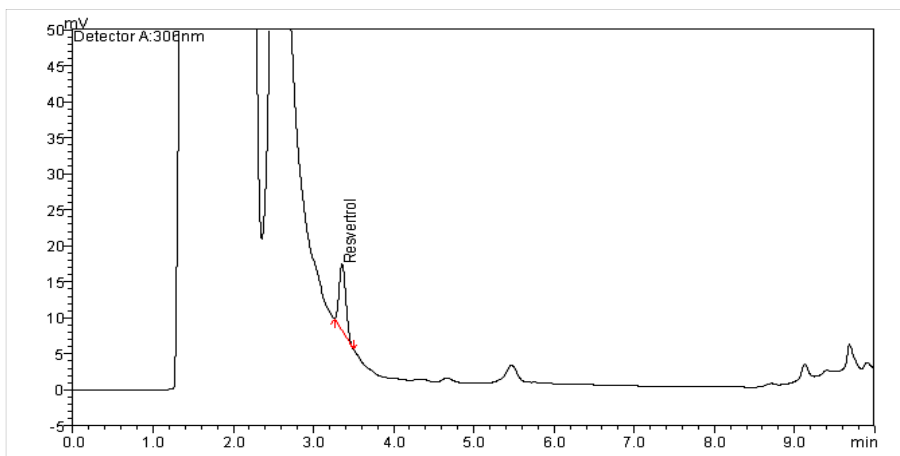


그림 189. 미광 하배엽 시료 분석 결과 크로마토그램

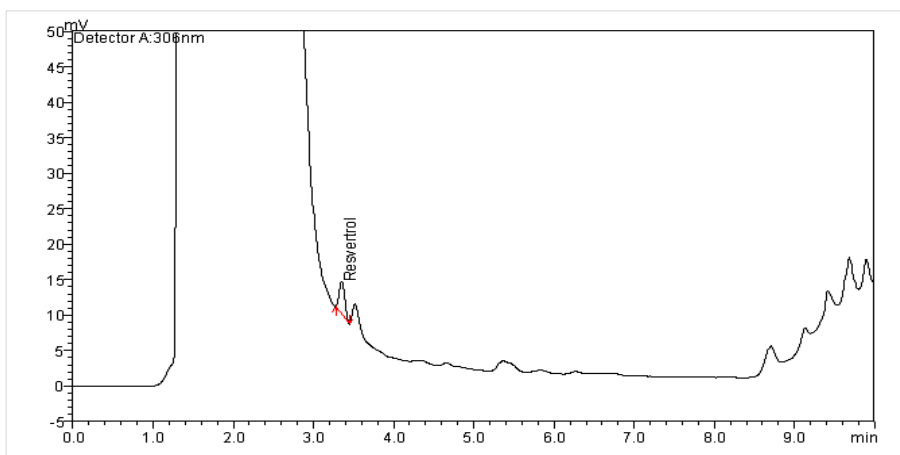


그림 190. 미광 뿌리 시료 분석 결과 크로마토그램

(마) UHPLC-MS/MS를 이용한 resveratrol 분석법 확립 실험

※ UHPLC는 Ultra-HPLC로 일반 LC에 비해 더 높은 압력으로 용매를 이송시킬 수 있어서, 입자가 더 작은 column을 사용하여 높은 분리능을 나타내면서 분석시간을 단축시키고, 높은 정밀도와 안정성 및 내구성이 높은 장점이 있다.

※ MS(Mass spectrometry)는 resveratrol의 분자량을 확인하여 resveratrol인지 아닌지를 알아낼 수 있기 때문에 HPLC에 비해서 정성과 정량을 동시에 할 수 있는 장점이 있다.

※ MS/MS는 원하는 resveratrol 분자를 선택적으로 선별해서 에너지를 가해 화합물을 분열시켜서 발생한 product 조각이온을 이용해 구조를 확인할 수 있고 또한 product 이온을 이용하여 정량 분석이 가능하다.

※ 본 연구실에서는 Shimadzu사의 UHPLC-MS/MS system (Shimadzu LCMS-8040)을 사용하여 resveratrol 성분을 분석할 수 있는 최적화 조건을 확립하기 위한 실험을 진행하였다.

① Resveratrol의 MRM optimization I

※ Optimization은 resveratrol의 분자이온을 선택적으로 분열시키고, 이때 생긴 product ion을 검출하는데 관련된 Q1, CE, Q3 조건을 확립하는 과정이다. Resveratrol 표준물질인 *trans*-resveratrol을 구입하여 MS/MS optimization을 수행하였다.

㉓ Resveratrol의 optimization

MRM (multiple reaction monitoring)을 이용한 정량분석방법은 Q1에서 이온화원에 생성된 이온 조각들 중 precursor ion(전구 이온)을 선택적으로 collision cell (충돌관)로 전달한다. collision cell에서는 Q1에서 선택된 precursor ion만이 collision cell로 이동하여 내부 충돌기체와 충돌함으로써 product ion(생성 이온)들을 형성하고, 이들 중 특징적인 이온만을 선택적으로 Q3로 전달한다.

이러한 MRM 분석법을 이용하면 동일한 질량을 가진 분석물질과 방해물질의 precursor ion이 Q1을 함께 통과하더라도 collision cell에서 생성되는 product ion이 각각 다르게 나타나므로 분석물질에 대한 product ion만 선택적으로 취하여 Q3로 이동시킴으로써 원하는 성분만을 검출할 수 있게 되어 높은 선택성과 감도로 분석할 수 있다 [그림 191].

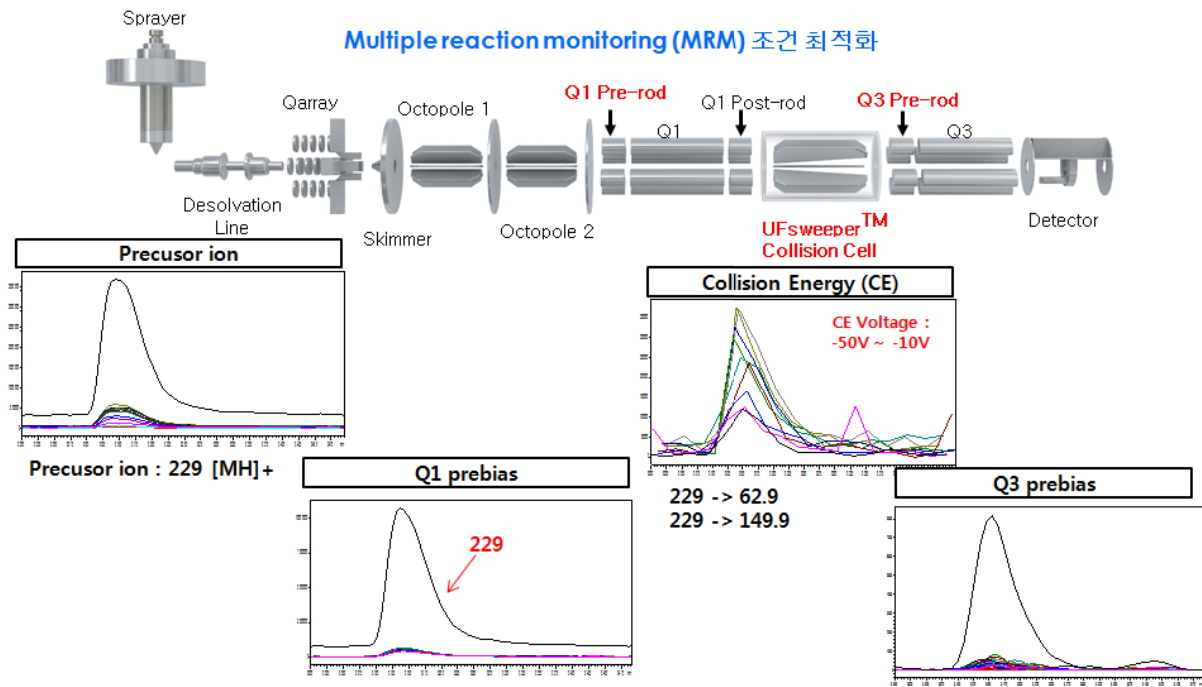


그림 191. Resveratrol의 MRM 조건 최적화 과정

㉞ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : Shimadzu LCMS-8040
(equiped with LC-30AD pump, SIL-30AC autosampler, CTO-30A column oven, SPD-20A UV-Vis detector and MS 8040 mass spectrometer)
- Ionization and analyzer type : ESI(Electro Spray Ionization)
- Column : Kinetex C18 column (100 × 2.1 mm, 2.6 micron)
 - Column oven temperature : 40 °C
- Mobile phase
 - Solvent A : Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B : Methanol + 0.1% formic acid
- Flow rate : 0.3 ml/min
- Injection volume : 5 μ l
- MS Analytical conditions
 - DL temperature : 250 °C
 - Heat block temperature : 400 °C
 - Interface(ESI) voltage : 4.5 kV
 - Drying gas flow : 15.0 L/min
 - Nebulizing gas flow : 3.0 L/min
 - Mass range : 100 ~ 450 m/z

㉔ Optimization 결과

Resveratrol optimization을 통하여 Q1 prebias, collision energy, product ion의 m/z, Q3 prebias를 확인한 결과는 다음과 같다.

■ Q1 prebias 결과

Resveratrol의 질량값이 229.0[M+H]⁺임을 확인하였다[그림 192, 193].

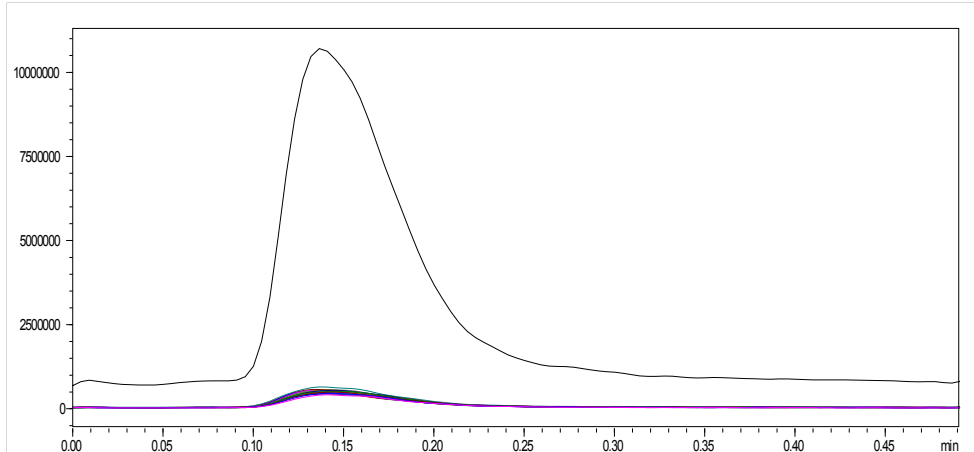


그림 192. Resveratrol의 Q1 prebias 결과 크로마토그램

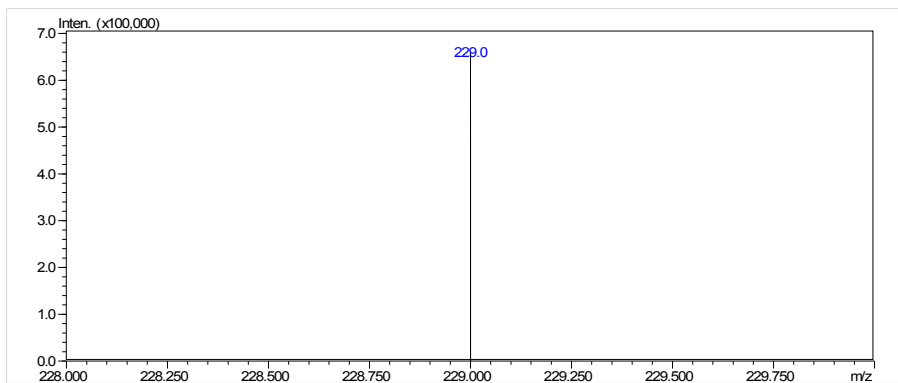


그림 193. Resveratrol의 MS spectrum

■ CE select 결과

CE select는 -50V부터 -10V까지 5V단위로 9개의 collision energy(volts)값을 설정하여 precursor ion을 분열시킨다. Collision energy 값에 따라 다양한 product ion들이 생성되는데 기기에서 자동적으로 제일 좋은 감도와 빈도가 높은 product ion을 나타내는 최적 전압을 선택하여 다음 단계로 진행시킨다. [그림 194, 195].

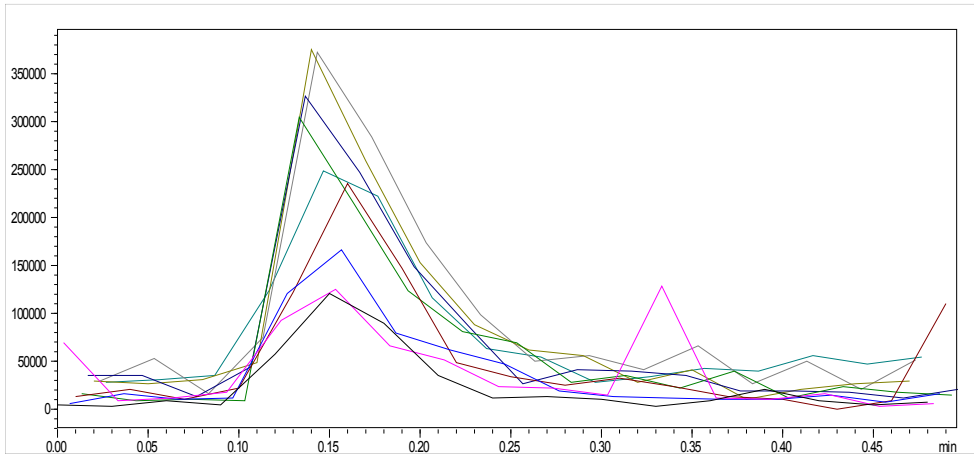


그림 194. CE select 분석 결과 크로마토그램

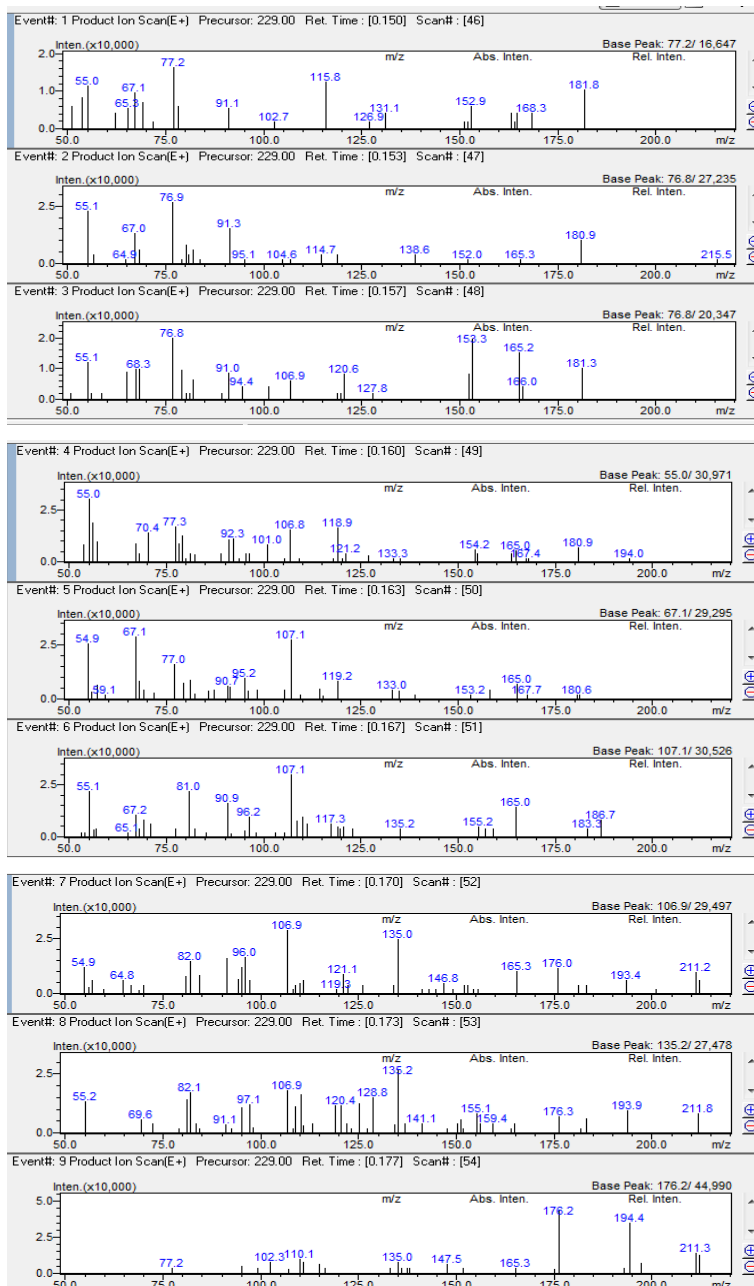


그림 195. CE select MS spectrum (위에서부터 -50V ~ -10V, 5V 간격)

■ Product ion 분석 결과

기기가 CE에서 가장 좋은 peak를 나타내는 최적 전압을 결정한 후 선택된 product ion 값 주변만 다시 0.1 m/z 단위 재분석한다. 기기가 자동 선택한 product ion값은 62.9(-45V)와 149.9(-35V) m/z임을 확인하였다[그림 196, 197].

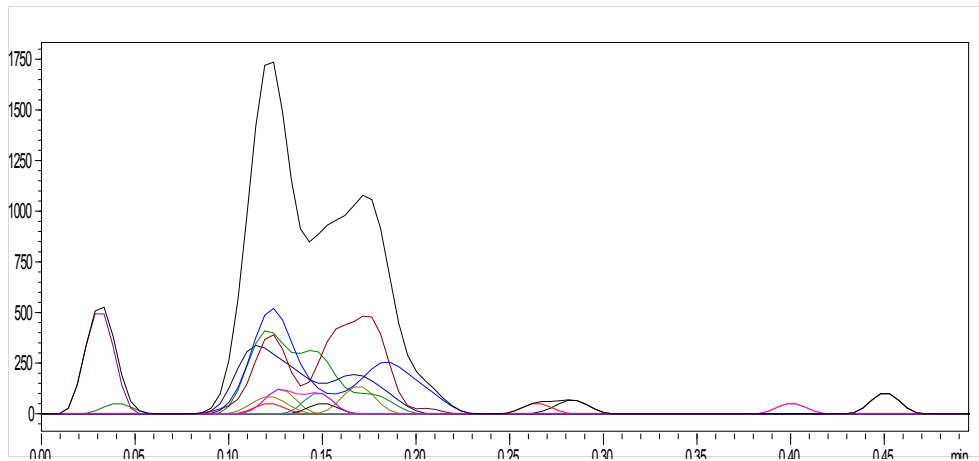


그림 196. Product ion 분석 결과 크로마토그램

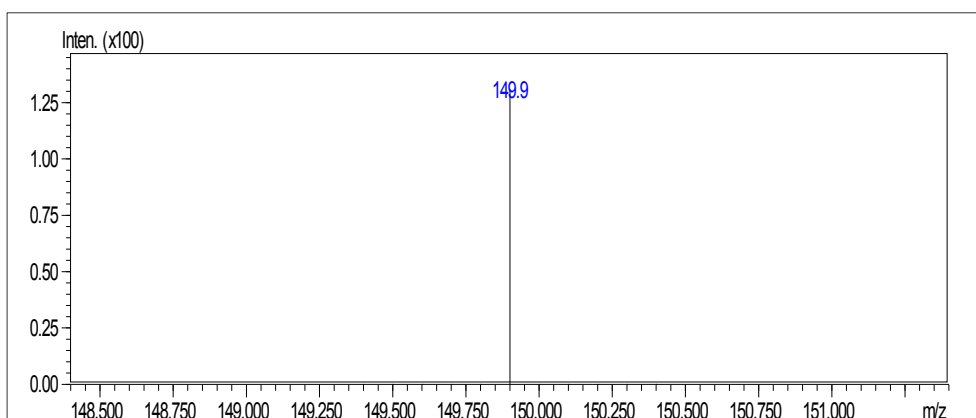
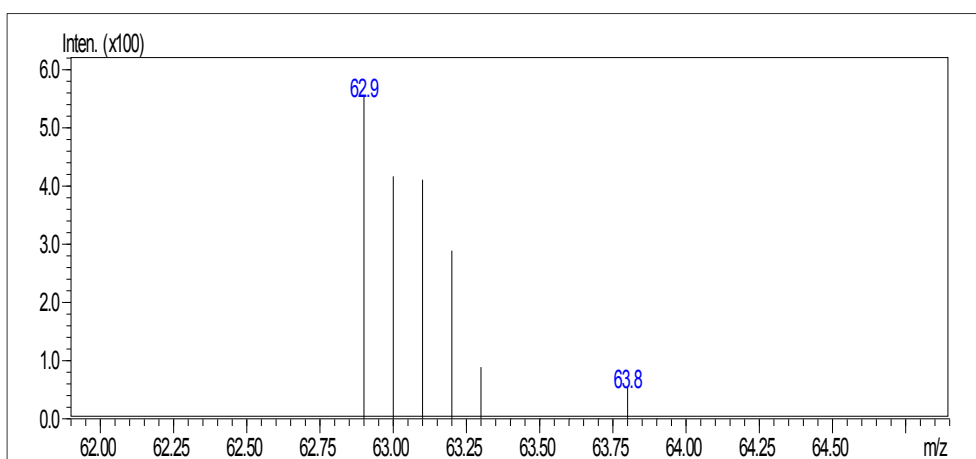


그림 197. Product ion MS spectrum 크로마토그램

■ Q3 prebias 결과

Q3 prebias는 Q1 prebias부터 product ion까지 확인된 결과를 바탕으로 한 번 더 peak를 확인한다. 최종적으로 resveratrol의 target ion은 62.9 m/z, reference ion은 149.9 m/z임을 확인하였다[그림 198, 199].

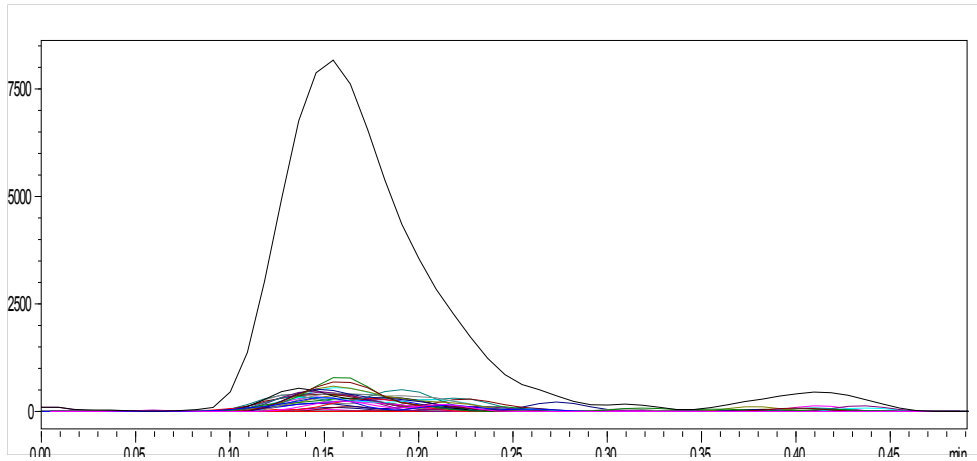


그림 198. Q3 prebias 결과 크로마토그램

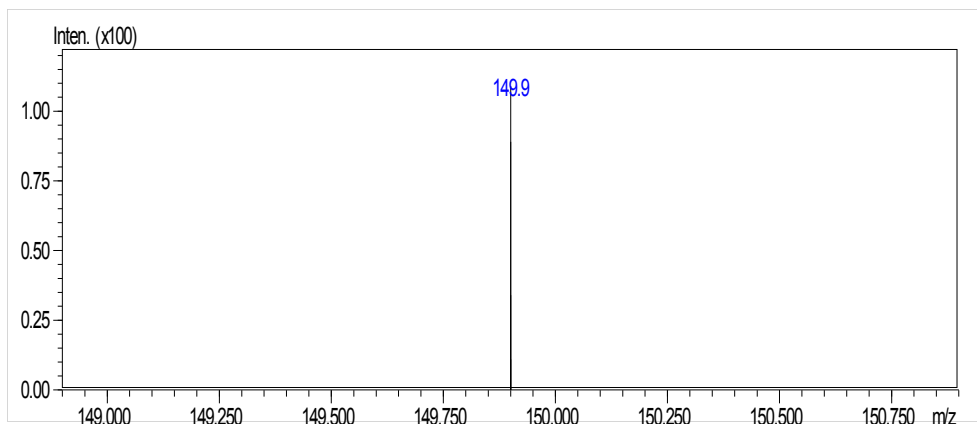
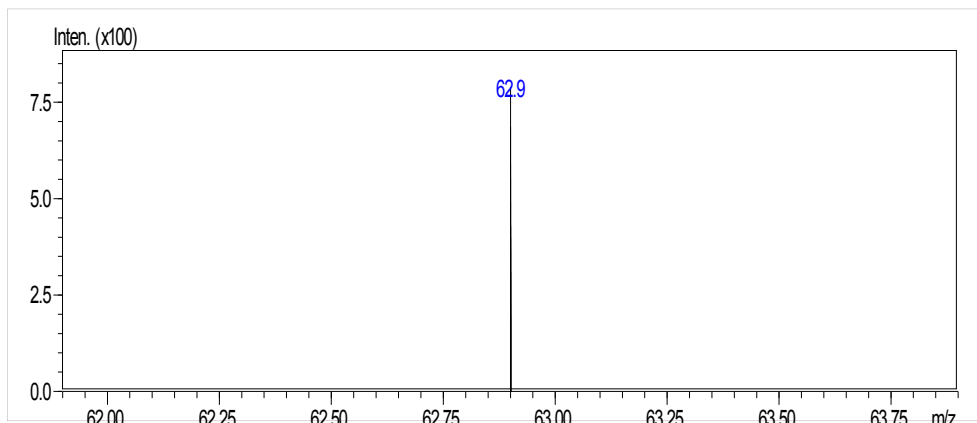


그림 199. Q3 prebias MS spectrum

■ Optimization 결과

Resveratrol의 MRM optimization 결과는 표 53과 같다. Optimization 결과를 통해서 가장 좋은 peak를 나타내는 collision energy (-11 V)를 선택하여 포도의 *trans*-resveratrol 성분을 분석해보았다.

표 53. Resveratrol의 MRM optimization 결과

Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q1 pre bias (V)	CE	Q3 pre bias (V)
229.0	62.9	-11.0	-45.0	-28.0
	149.9	-11.0	-35.0	-26.0

■ 시료 분석 결과

MRM optimization 결과를 바탕으로 포도(Campbell Early) 시료에 적용하여 분석해보았다. 그 결과 포도에 함유된 *trans*-resveratrol 함량은 1 g당 134.9 ng 존재하는 것을 확인하였다[그림 200, 201].

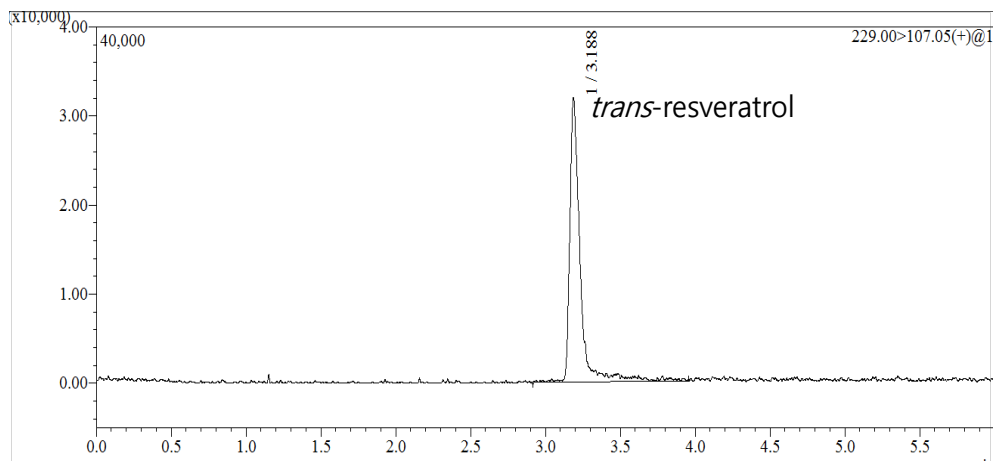


그림 200. *trans*-Resveratrol 표준용액(50 ppb) 분석 결과 크로마토그램

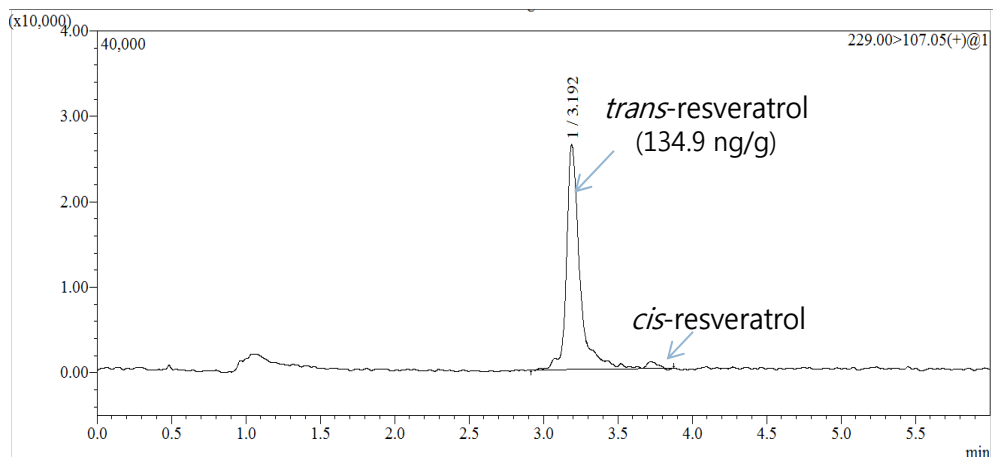


그림 201. Campbell Early 시료 분석 결과 크로마토그램

② Resveratrol의 MRM optimization II (I 방법 개선)

※ 본 연구실에서는 *trans*-resveratrol에 대한 MRM optimization 과정을 진행하였다. 그런데 positive mode[M+H]⁺에서 CE select 결과 peak가 갈라져 나타나고, 표준물질의 MRM 분석 결과 tailing 현상이 나타나며 *cis*-resveratrol이 함께 나타나는 등 일부 문제점들을 개선할 필요가 있었다.

MRM 조건을 negative mode[M-H]로 변경하여 분석하면서 이동상을 methanol에서 acetonitrile로 변경하였다. 또한, 분석 컬럼은 2.6um에서 1.9um 크기의 입자가 작은 것을 사용하고, 시료 분석을 위한 기기 분석 시간을 단축하기 위해 gradient elution을 8분으로 단축하였다. 그리고 최종 확립된 조건을 다양한 포도 시료에 적용하여 정량분석 하였다.

㉞ 분석조건

- Column : Thermo Hypersil Gold aQ column (100 X 2.1 mm, 1.9 um)
 - Column oven temperature : 40 °C
- Mobile phase
 - Solvent A : Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid
- Gradient elution

Time (min)	% A	% B
0.0	5	95
2.0	5	95
5.0	10	90
7.0	10	90
7.1	5	95
8.0	5	95

- Flow rate : 0.3 ml/min
- Injection volume : 5 µl
- MS Analytical conditions
 - DL temperature : 250 °C
 - Heat block temperature : 400 °C
 - Interface(ESI) voltage : -4.5 kV
 - Drying gas flow : 15.0 L/min
 - Nebulizing gas flow : 3.0 L/min
 - Mass range : 100 ~ 450 m/z

㉞ Optimization 결과

Resveratrol optimization을 통하여 negative mode에서 Q1 prebias, collision energy, product ion의 m/z, Q3 prebias를 확인한 결과는 다음과 같다.

■ Q1 prebias 결과

Resveratrol의 질량값이 227.1[M-H]⁻임을 확인하였다[그림 202, 203].

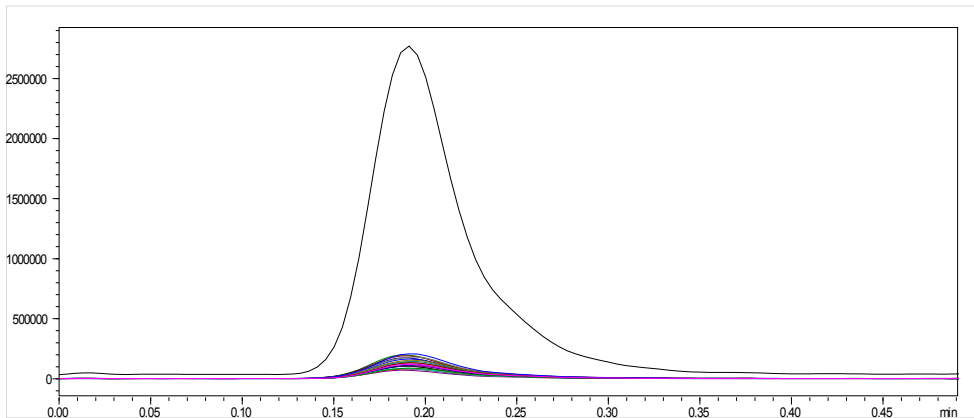


그림 202. Resveratrol의 Q1 prebias 결과 크로마토그램

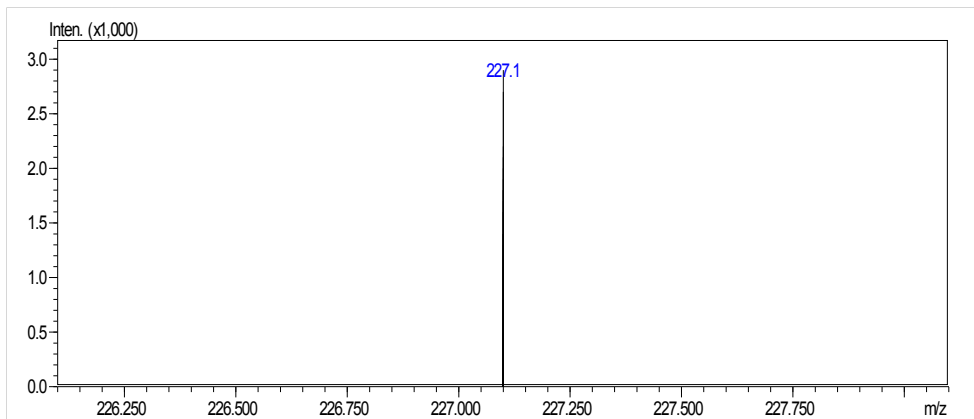


그림 203. Resveratrol의 MS spectrum

■ CE select 결과

CE select는 10V부터 50V까지 5V단위로 9개의 collision energy(volts)값을 설정하여 precursor ion을 분열시킨다. Collision energy 값에 따라 다양한 product ion들이 생성되는데 기기에서 자동적으로 감도와 빈도가 높은 product ion을 나타내는 최적 전압을 선택하여 다음 단계로 진행시킨다. CE select 결과에서 자동 선택된 값은 143.3 m/z (28V)와 185.3 m/z (18V)로 확인되었다[그림 204, 205].

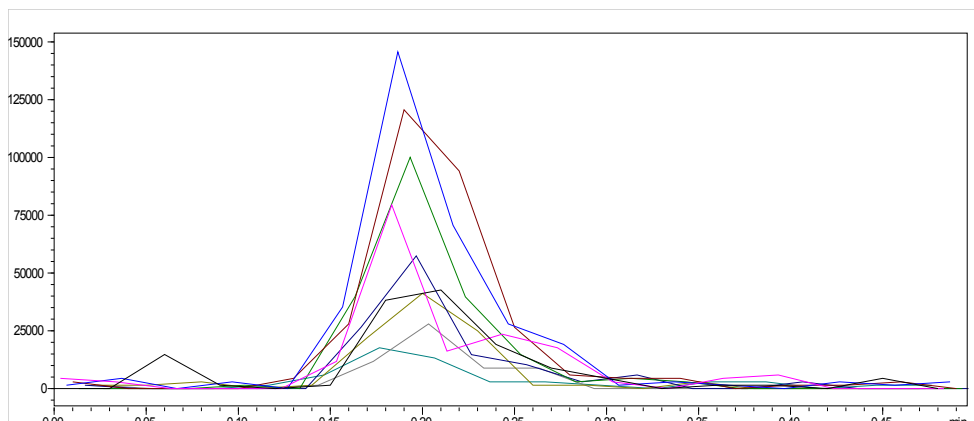


그림 204. CE select 분석 결과 크로마토그램

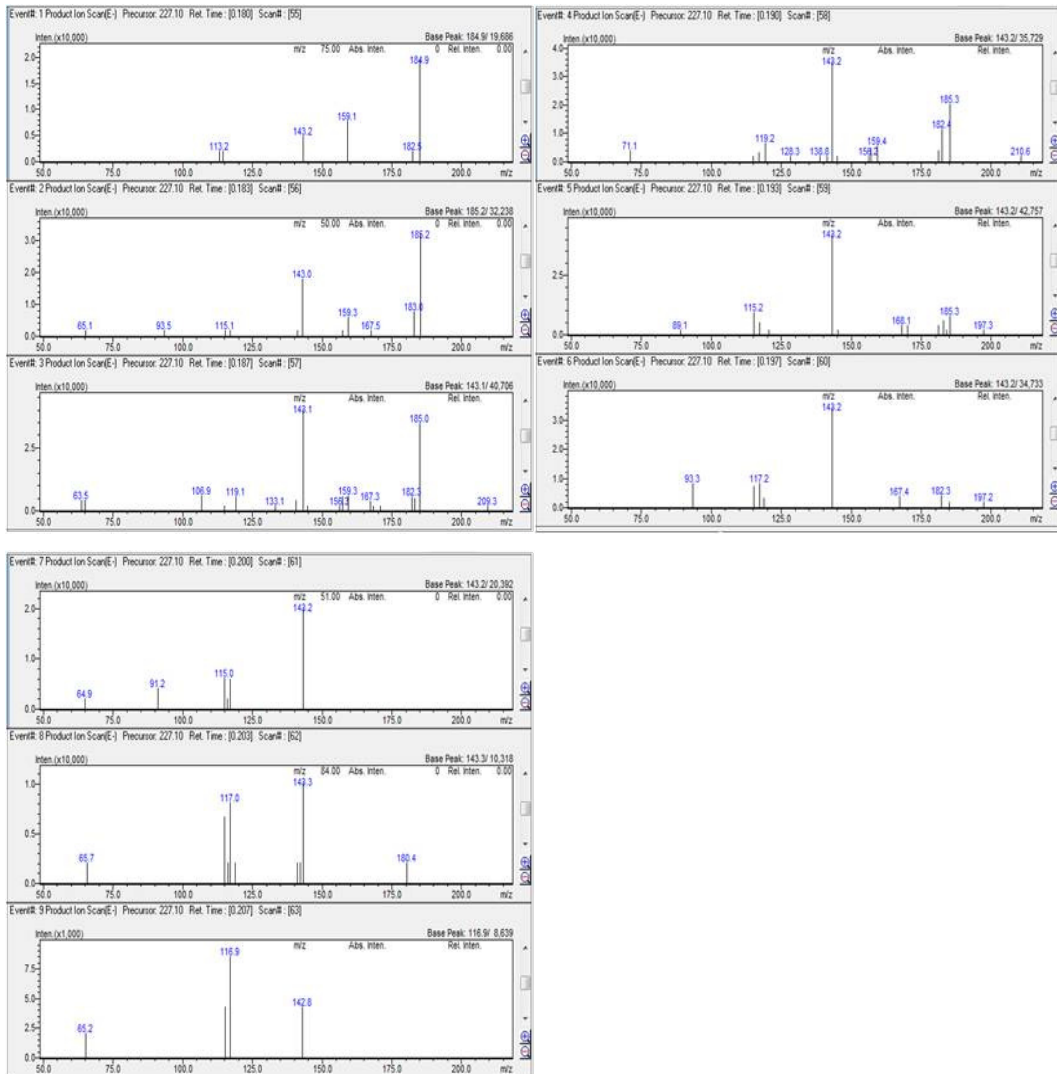


그림 205. CE select MS spectrum (왼쪽 위부터 시계방향으로 10V ~ 50V, 5V 간격)

■ Product ion 분석 결과

기기가 CE에서 가장 좋은 peak를 나타내는 최적 전압을 결정한 후 선택된 product ion값 주변만 다시 0.1 m/z 단위 재분석한다. 기기가 자동 선택한 product ion값은 143.3 m/z (28V), 185.1 m/z (18V)임을 확인하였다[그림 206, 207].

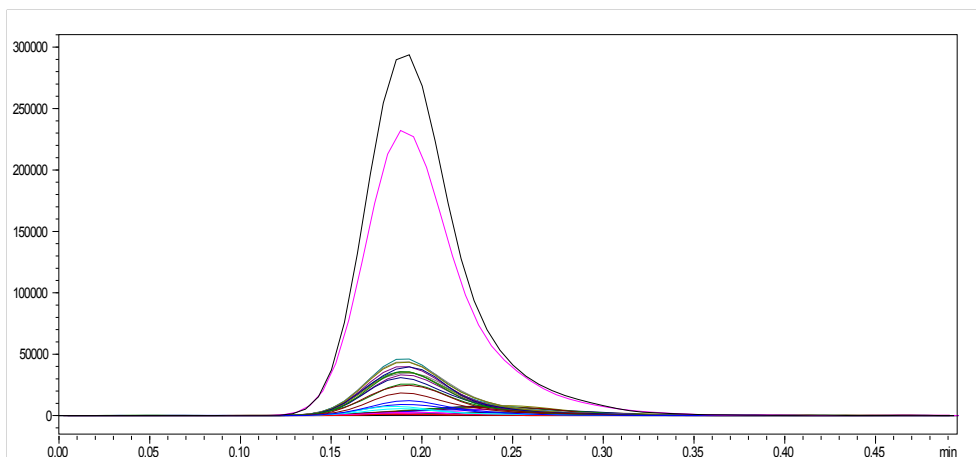


그림 206. Product ion 분석 결과 크로마토그램

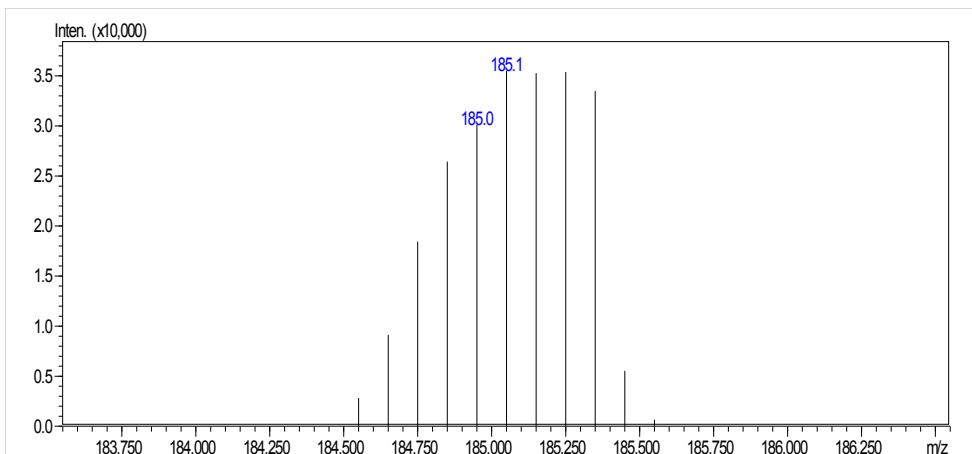
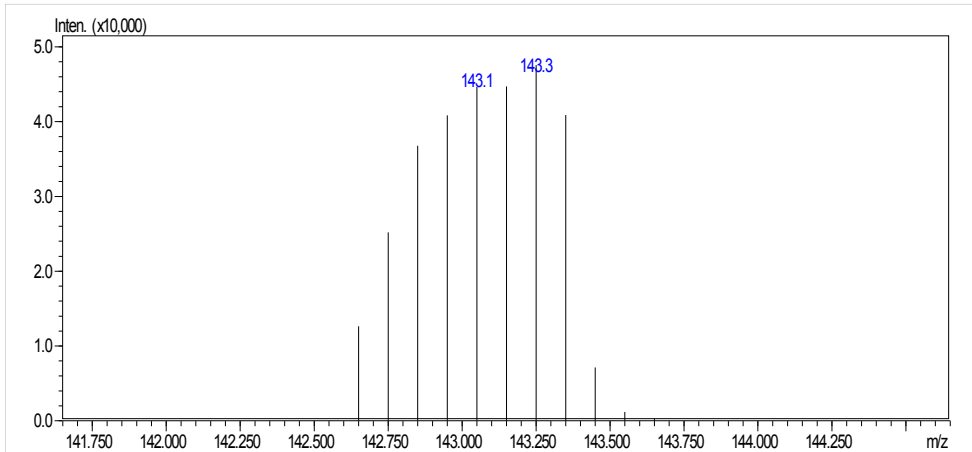


그림 207. Product ion MS spectrum 크로마토그램

■ Q3 prebias 결과

Q3 prebias는 Q1 prebias부터 product까지 확인된 결과를 바탕으로 한 번 더 peak를 확인한다. 최종적으로 resveratrol의 target ion은 143.3 m/z, reference ion은 185.3 m/z임을 확인하였다[그림 208, 209].

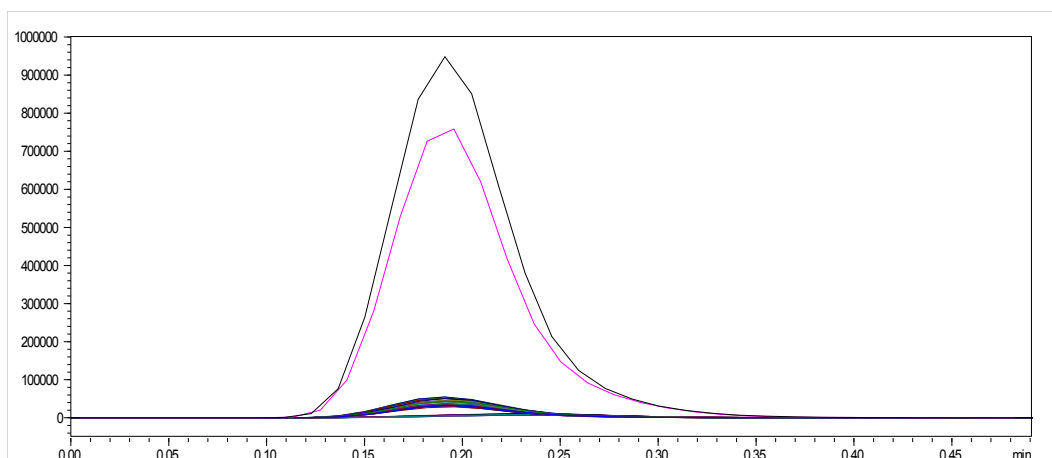


그림 208. Q3 prebias 결과 크로마토그램

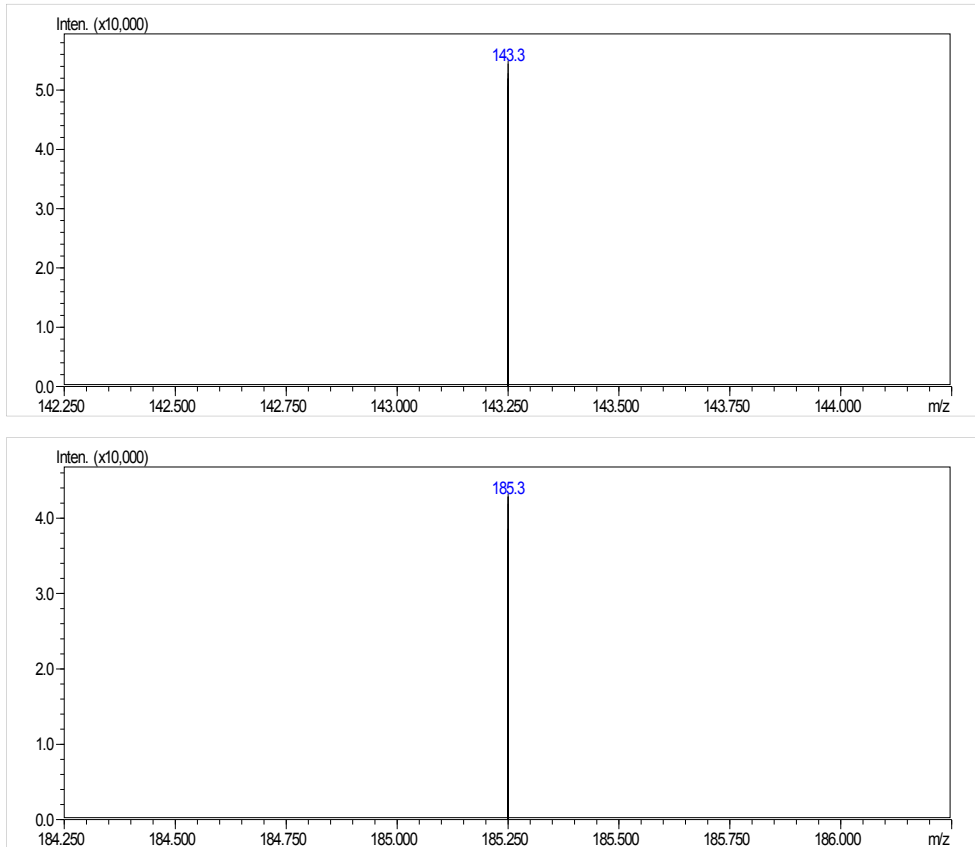


그림 209. Q3 prebias MS spectrum

■ Optimization 결과

Resveratrol의 MRM optimization 결과 분석 컬럼과 이동상 용매가 바뀌어도 positive mode[M+H]⁺에서는 I 방법과 비슷하게 resveratrol peak가 갈라지는 현상이 나타났다. 반면, negative mode[M-H]⁻에서는 peak 갈라짐 현상 없이 8분 이내에 빠르게 정량분석이 가능하였다. Optimization 결과를 통해서 product ion 각각에 맞는 collision energy를 선택하여 다양한 포도의 *trans*-resveratrol 성분을 분석해보았다[표 54].

표 54. Resveratrol의 MRM optimization 결과

Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q1 pre bias (V)	CE	Q3 pre bias (V)
227.1	143.3	11.0	28.0	25.0
227.1	185.3	11.0	18.0	19.0

㊦ 시료 분석 결과

MRM optimization 결과를 바탕으로 포도 시료를 분석하였다[그림 210-212].

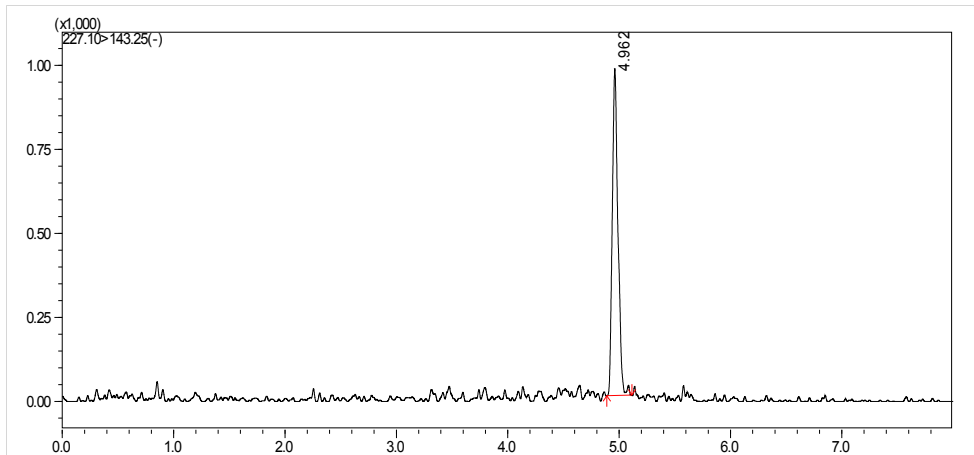


그림 210. *trans*-Resveratrol 표준용액(50 ppb) 분석 결과 크로마토그램

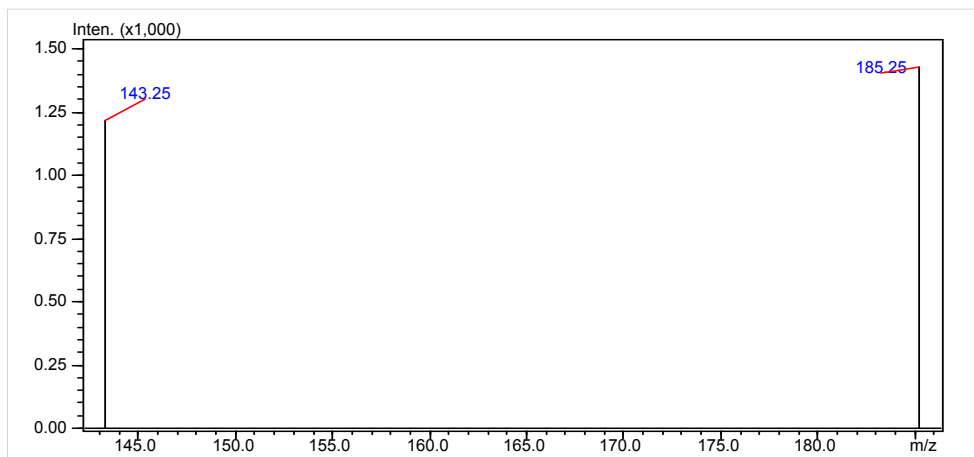


그림 211. *trans*-Resveratrol 표준용액(50 ppb) MS spectrum

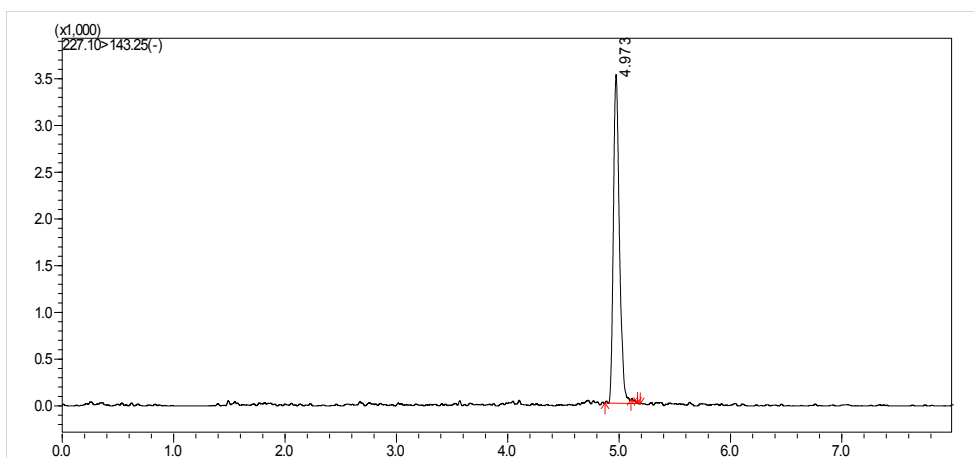


그림 212. Campbell Early(캠벨) 시료 분석 결과 크로마토그램

③ 분석법 검증

※ UHPLC-MS/MS 분석 방법의 유효성을 확인하기 위해 검출한계, 정량한계, 재현성 및 직선성 실험을 진행하였다.

㉞ 검출한계, 정량한계

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 분석기기의 감도를 검증할 수 있는데, 다양한 농도의 표준용액을 분석하여 S/N ratio(signal과 noise의 비율)을 구하고, 검출한계는 S/N > 10배, 정량한계는 S/N > 30배(LOD의 4배 이상)로 하였다[표 55].

UHPLC-MS/MS에서 확인된 resveratrol의 검출한계(LOD)는 0.25 ng, 정량한계(LOQ)는 1 ng이었다. HPLC 결과[표10]과 비교해보면 감도가 10배 향상된 것을 알 수 있다.

표 55. Resveratrol 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

	LOD(ng)	LOQ(ng)
Resveratrol	0.25	1

㉞ 분석의 재현성

분석의 재현성 실험은 일정한 양의 표준품을 7번 이상 반복 주입 분석하여 머무름 시간(t_R), peak의 면적(Area)의 오차를 조사하는데, 전체적으로 분석기기의 안정성을 알아보기 위해 수행한다. *trans*-resveratrol의 정량한계에 해당하는 농도(20 ppb)를 연속으로 7번 분석한 결과, t_R , area 의 반복 분석간 오차가 작아 기기가 안정적이고 재현성 있는 분석을 수행할 수 있음을 확인하였다[표 56].

표 56. Resveratrol의 재현성 실험 결과

Resveratrol 20 ppb	1	2	3	4	5	6	7	Average	C.V(%)
t_R	5.017	5.006	4.994	4.979	4.976	4.958	4.980	4.987	0.40
Area	1,309	1,530	1,596	1,528	1,157	1,460	1,377	1,422	10.72

㉞ 검량선의 직선성

▣ 표준용액 조제

Resveratrol 표준용액 각각의 농도를 5 μ l씩 주입하여 MRM 분석 후 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 213].

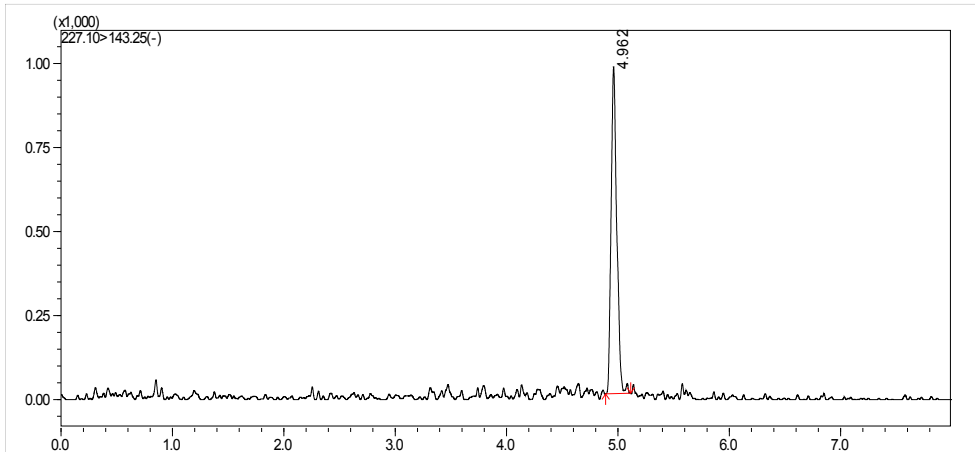


그림 213. Resveratrol 표준용액(50 ppb) 분석 결과 크로마토그램

■ 표준용액(5~500 ppb) 검량선의 직선성

Resveratrol 표준용액(5~500 ppb)을 분석하여 얻은 검량선은 $R^2=0.999$ 이상으로 직선성이 우수함을 확인하였다[그림 214, 표 57].

표 57. Resveratrol 표준용액의 검량선 및 직선성

	Calibration curve	R^2
Resveratrol	$y=70.3471x-30.1756$	0.999

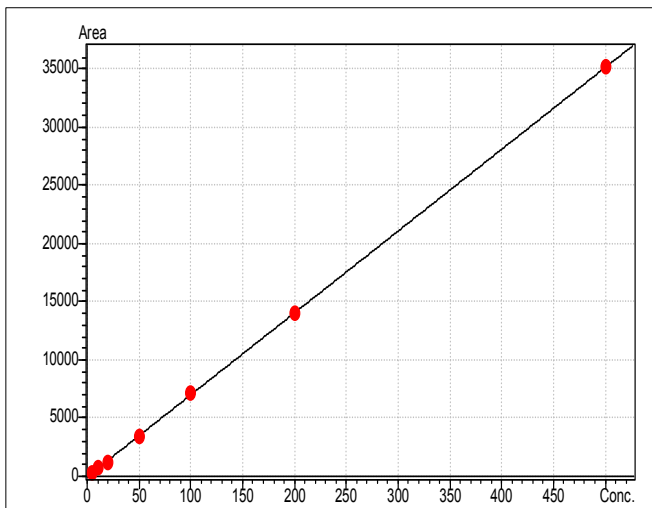


그림 214. Resveratrol 검량선

④ 시료 추출 방법의 확립

실험에 사용된 포도는 적포도인 campbell early(캠벨), muscat bailey A(MBA, 머루), steuben(스튜벤)과 청포도 종류인 topaz(토파즈), seneca(세네카)로 모두 5종이다. 그리고 적포도로 만든 포도주스와 와인을 함께 추출하여 분석 시료로 사용하였다.

Resveratrol 추출은 HPLC-UV에서 확립된 방법과 동일하게 추출하였다.

시료 1 g에 80% methanol 10 ml을 넣고 약 10초 동안 vortex하였다. 시료가 담긴 tube를 ultrasonicator에 넣고 1시간 동안 초음파 추출하였다. 추출물의 상층액을 0.2 µm syringe filter로 여과한 다음 UHPLC-MS/MS로 분석하였다. 모든 시료는 3반복 추출하였다.

⑤ 포도 및 포도 제품의 resveratrol 분석

※ UHPLC-MS/MS로 확립/검증된 분석법을 이용하여 다양한 포도 시료(캠벨, 머루, 스투벤, 세네카, 토파즈) 및 포도주스, 와인의 resveratrol 함량을 분석하였다.

㉔ 기기 분석 조건

- Instrument : Shimadzu LCMS-8040
- Ionization and analyzer type : ESI(Electro Spray Ionization)
- Column : Thermo Hypersil Gold aQ column (100 × 2.1 mm, 1.9 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid
 - Gradient elution

Time (min)	% A	% B
0.0	5	95
2.0	5	95
5.0	10	90
7.0	10	90
7.1	5	95
8.0	5	95

- Flow rate : 0.3 ml/min
- Injection volume : 5 µl
- MS Analytical conditions
 - DL temperature : 250 °C
 - Heat block temperature : 400 °C
 - Drying gas flow : 15.0 L/min
 - Nebulizing gas flow : 3.0 L/min

㉔ 시료 분석 결과

■ 시료별 resveratrol 함량

포도 및 포도 제품의 resveratrol 성분을 분석한 결과 campbell의 resveratrol 함량이 1g 당 1558.6 ng(평균값)으로 가장 높게 나타났다. Resveratrol 함량은 campbell>grape juice>topaz>MBA>seneca>steuben>wine 순으로 높았다[표 58].

표 58. 포도 및 포도 제품의 resveratrol 함량 결과

포도 종류	Resveratrol 함량(ng/g)	Average	C.V. (%)
Campbell 1	1802.3	1558.6	0.3
Campbell 2	972.6		
Campbell 3	1900.9		
MBA 1	1280.9	1047.7	0.3
MBA 2	702.4		
MBA 3	1159.8		
Steuben 1	151.3	150.6	0.2
Steuben 2	124.9		
Steuben 3	175.5		
Seneca 1	162.5	260.7	0.7
Seneca 2	458.1		
Seneca 3	161.5		
Topaz 1	1252.6	1072.7	0.1
Topaz 2	1011.8		
Topaz 3	953.8		
Grape juice 1	1108.8	1172.3	0.2
Grape juice 2	955.9		
Grape juice 3	1452.1		
Wine 1	69.8	75.5	0.1
Wine 2	73.1		
Wine 3	83.5		

■ 시료 분석 결과 크로마토그램

포도 및 포도 제품의 분석 결과 크로마토그램은 그림 215-221과 같다.

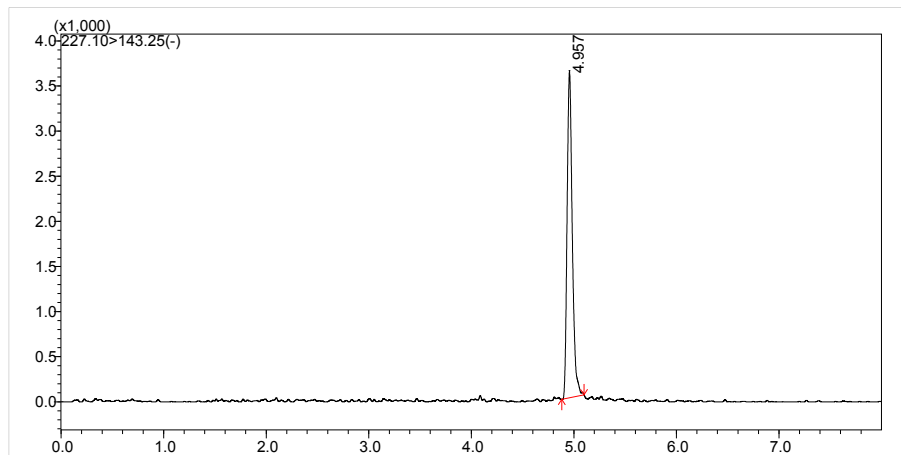


그림 215. Campbell Early 시료 분석 결과 크로마토그램

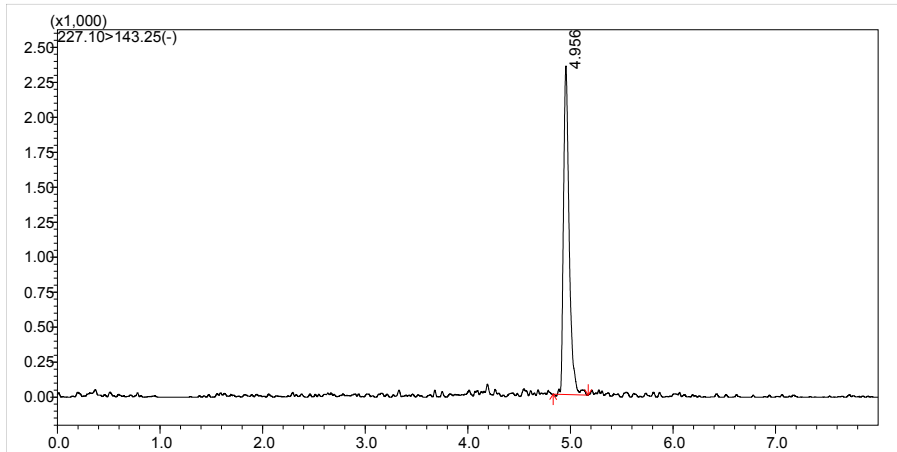


그림 216. MBA 시료 분석 결과 크로마토그램

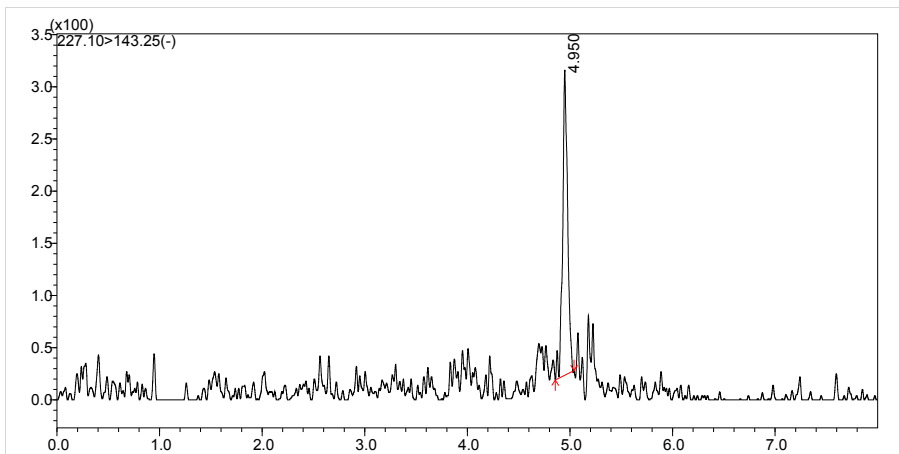


그림 217. Steuben 시료 분석 결과 크로마토그램

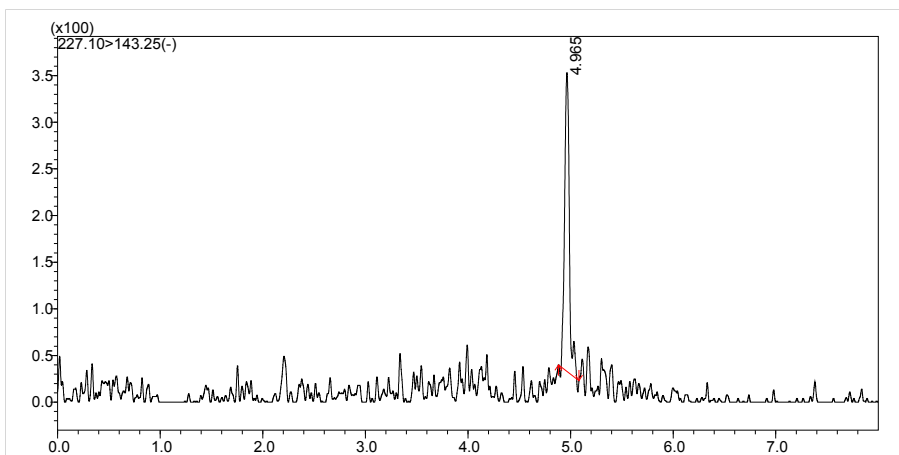


그림 218. Seneca 시료 분석 결과 크로마토그램

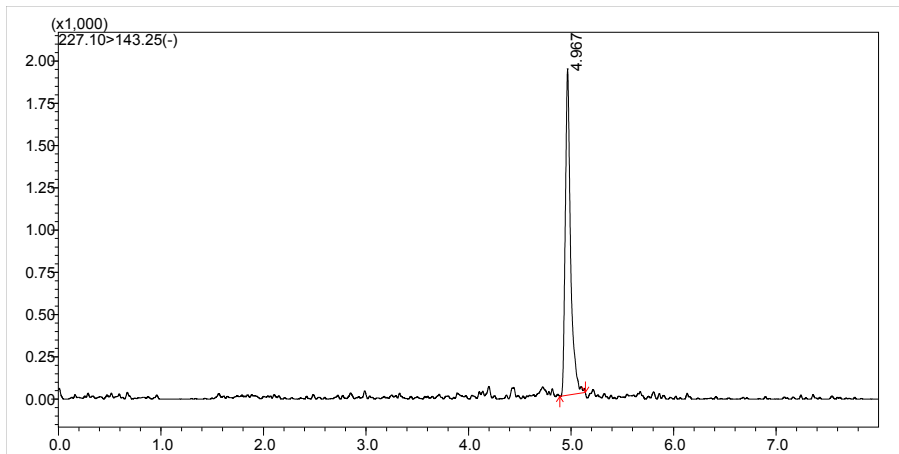


그림 219. Topaz 시료 분석 결과 크로마토그램

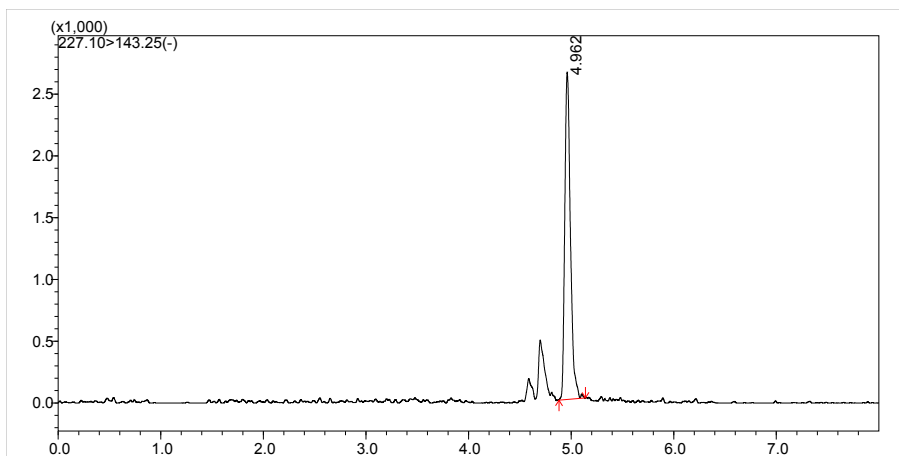


그림 220. 적포도주스 시료 분석 결과 크로마토그램

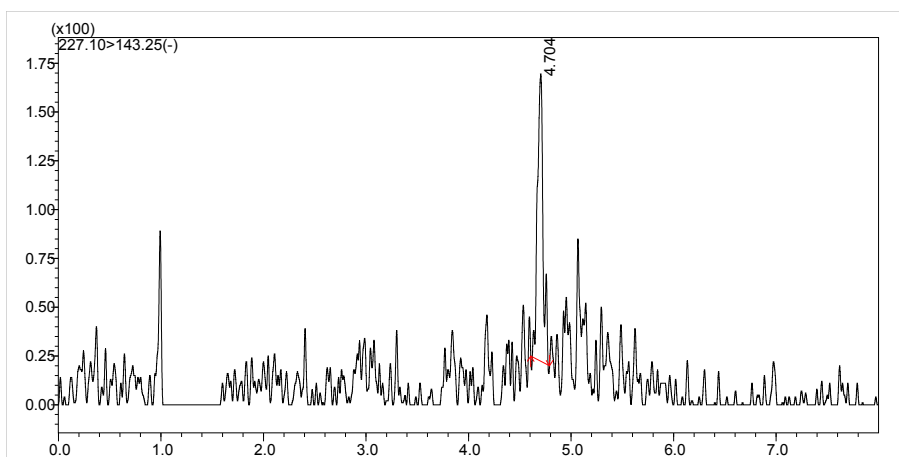


그림 221. 와인 시료 분석 결과 크로마토그램

(2) 포도 등에 함유된 유기산 성분 분석 기술 개발

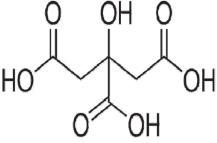
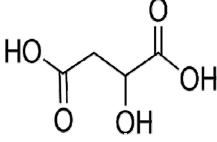
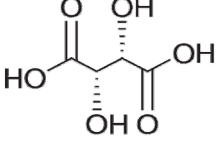
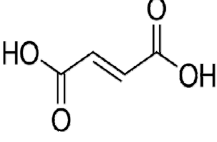
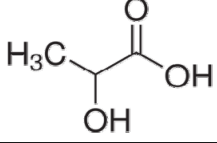
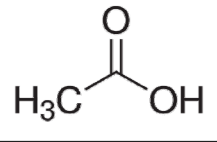
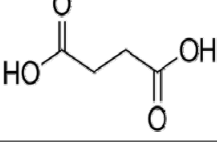
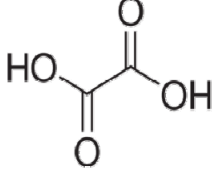
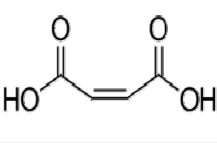
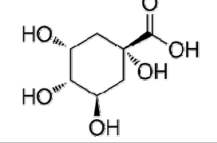
(가) 유기산 (Organic acid)

유기산은 carboxyl기(-COOH)를 갖는 유기 화합물의 총칭이다. 주로 탄소와 수소로 구성되어 있고 질소, 황 등을 포함하기도 한다. Carboxyl기를 갖는 화합물은 많지만 일반적으로 신맛을 띠는 좁은 의미로 사용되고 있다. 아미노산이나 지방산은 carboxyl기를 갖지만 유기산에 포함되지 않는다. 그러나 acetic acid(아세트산), butyric acid(낙산) 등 지방산 중 휘발성의 저급지방산은 휘발성 유기산이라 하여 유기산에 포함시키고 있다. Carboxyl가 1개인 유기산은 일염기산(ex. acetic acid), succinic acid(호박산)과 같이 2개 있는 것은 이염기산, citric acid(구연산)와 같이 3개가 있는 것은 삼염기산이라고 한다. 식품 중에 함유되어 있는 유기산의 carboxyl기 개수는 1~3개이다. 일반적으로 citric acid(구연산), tartaric acid(주석산), fumaric acid(푸마르산), malic acid(사과산), lactic acid(젖산), acetic acid(초산) 등의 유기산이 동식물계에 널리 존재하고 있고 그 중 citric/tartaric/malic acid는 pH 조정이나 신맛을 내는 산미료로서 사용되고 있다. 식품에 함유되는 유기산의 종류나 조성은 식품의 품질검사나 발효공정의 관리, 선도평가 등에서 중요한 분석 항목이 되는 경우가 많다. 이 외에도 TCA 회로를 구성하거나 발효에 의해 생성되기도 한다.

과일에서의 유기산은 기본적인 화합물 중 하나인데, 과일의 유기산이 중요한 이유는 유기산이 과일의 관능적 특성에 지대한 영향을 끼치기 때문이다. 관능적 특성이란 특정 품질을 감각기관의 직접적인 느낌으로 조사, 평가하여 술이나 향료 등의 품질의 특성을 판별하거나 가리는 일을 의미한다. 각 과일의 유기산 함량은 그 품종이나 토양, 작물의 스트레스 등에 의해 결정되는데, 국립농업과학원의 자료(2008)에 따르면 citric acid, malic acid, tartaric acid가 과일에 주로 존재하는 유기산들이다. 이 3가지 유기산 성분은 과일 음료의 맛을 강화하는데 쓰이기도 한다.

다양한 유기산의 종류와 그 구조식은 표 59.와 같다.

표 59. 유기산의 종류 및 구조식

유기산 종류	구조식
Citric acid (시트르산)	
Malic acid (말산)	
Tartaric acid (주석산)	
Fumaric acid (푸마르산)	
Lactic acid (젖산)	
Acetic acid (초산)	
Succinic acid (석신산, 호박산)	
Oxalic acid (옥살산)	
Maleic acid (말레산)	
Quinic acid (퀸산)	

유기산은 주로 유해균에 대한 살균효과 및 장내 세균의 balance를 조절하는 역할을 한다. 또한 신진대사를 도와 체력을 증진시키고, 피로회복 및 미용에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 최근 hydroxy acid(AHA) 성분이 피부노화방지, 여드름 개선, 색소 침착 방지 등의 효능이 있어 이 성분을 함유한 화장품 개발이 많이 진행되고 있다.

국립농업과학원 자료에 따른 포도, 감귤, 사과 등 작물의 종류별 유기산 함량은 표 60과 같다. 대부분의 주요 구성 성분은 citric acid, malic acid, tartaric acid이다.

표 60. 작물별 유기산 함량 및 주요 구성 성분

작물	유기산 함량	주요 구성 성분
사과	0.2 ~ 0.8%	Malic acid, citric acid, tartaric acid
배	0.2%	Malic acid, citric acid
포도	0.31 ~ 0.95	Tartaric acid (40~60%), malic acid
복숭아	0.5%	Malic acid, citric acid
단감	0.1 ~ 0.15%	Malic acid이 대부분임. citric acid, tartaric acid
감귤	1.04 ~ 1.20%	Citric acid (75.7~96.2%)
매실	4 ~ 5%	Citric acid, malic acid
레몬	6 ~ 7%	Citric acid
자두	1 ~ 2%	Malic acid
석류	1.5%	Citric acid
딸기	0.6 ~ 1.5%	Malic acid, citric acid
완숙토마토	0.7%	Citric acid (0.3~1%)
유자	과육 6.6%, 과피4.6%	Citric acid가 과피 62.3%, 과육 56.4% 존재
파인애플	0.5 ~ 3%	Malic acid, citric acid

(나) 유기산 분석법 확립

유기산은 주로 spectrophotometry, enzymatic methods, gas chromatography(GC), liquid chromatography(LC)등 여러 가지 방법으로 연구되고 있다. 최근 들어서는 HPLC 및 LC-MS로 진행되는 연구가 더 각광받는데 그 이유는 이 방법이 GC에 비해 더욱 간단하고 빠르고 안정적인 방법이기 때문이다. GC의 경우 유도체화 과정을 거쳐야 하는 단점을 가지고 있어 시간이 상대적으로 오래 걸리며, 유해한 용매를 사용하므로 위험도도 높다.

본 연구실에서는 HPLC-UV를 이용하여 유기산 추출 및 분석조건을 확립하고자 하였다.

① 유기산 분석용 표준용액의 제조

유기산 표준용액은 Supelco에서 구매하였다. 유기산의 종류는 acetic acid, tartaric acid, citric acid, lactic acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid, malic acid, oxalic acid, ascorbic acid로 총 10종의 유기산 표준용액을 제조하여 실험하였다.

유기산 표준품 중 succinic acid, lactic acid, citric acid는 각 10 mg을 증류수 5 mL에 녹여 2000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였고, 그 이외의 표준품은 5 mg을 증류수 5 mL에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Stock solution은 각각 10배 희석하여 200 ppm, 100 ppm의 working solution을 제조하였다. 각각 만들어진 표준용액은 분석 조건을 확립하기 위한 예비실험을 진행하면서 동시분석을 위해 일정 비율로 혼합하여 혼합표준용액으로 사용하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

② 유기산 분석을 위한 HPLC 기기조건 확립

※ 일반적으로 HPLC를 이용한 유기산 분석 방법 연구들은 이동상으로 potassium phosphate buffer를 많이 사용하고 있다. 그러나 HPLC 분석에 buffer가 사용되는 경우는 많지만 매번 만들기도 번거롭고 pH 보정을 해도 값이 달라지면 분석 결과에 영향을 줄 수 있다. 또한 장시간 buffer를 사용하면 기기에 염(salt)이 발생하여 pump가 막히는 문제가 생길 수 있고, MS 분석에도 적합하지 않다. 그래서 buffer 보다는 acetic acid, formic acid, phosphoric acid 등과 같은 산을 첨가하는 방법을 이용하여 기기 분석 조건을 확립하고자 한다.

본 연구실에서는 문헌조사를 통해 가장 많이 사용되면서도 효율적인 정량분석이 가능한 방법을 적용하고 필요에 따라 실험실에 맞게 변경하여 유기산 분석 조건을 확립하였다.

㉠ 컬럼 및 이동상 구성에 따른 peak 변화 비교

▣ M.A. van Straten 방법

M.A. van Straten는 ZORBAX SB-Aq (150x4.6mm, 5 μ m) 컬럼을 사용하여 유기산의 동시분석 조건을 확립하였다. 이동상으로는 20mM phosphate buffer(pH 2.0)와 acetonitrile를 사용하였고 UV 파장 210nm에서 분석하였다. 유기산 성분은 tartaric, malic, lactic, ascorbic, acetic, citric succinic, maleic, fumaric acid로 총 9종을 분석하였는데 그중 lactic acid와 ascorbic acid는 peak가 겹쳐 2개의 그룹으로 표준용액을 나눠 분석하였다.

본 연구실에서는 M.A. van Straten의 방법에서 유기산 표준용액을 나누지 않고 Luna C18 column(250x4.6mm, 5 μ m)을 연결하여 겹쳐지는 peak가 분리되는지 확인해보았다. 그리고 이동상으로 사용되는 potassium phosphate buffer는 phosphoric acid로 pH 2.9에 맞춰 보정하였다. 그리고 ascorbic acid 대신 oxalic acid로 바꿔 9종의 표준혼합용액을 만들어 확인해보았다[표 61, 62].

유기산 9종 표준용액 100ppm을 분석한 결과 oxalic acid와 tartaric acid가 겹치긴 하지만 분리가 가능한 수준이고, 다른 유기산은 모두 겹치지 않고 분리가 잘 된 것을 확인하였다[그림 222].

표 61. 기기 분석 조건

분석기기	Agilent HP1100 series HPLC
검출기 파장	UV 210nm
컬럼	Zorbax SB-aQ (150x4.6mm, 5um) + Luna C18 (150x4.6mm, 5um)
이동상 A	20mM Potassium phosphate (pH 2.9)
이동상 B	Acetonitrile
유속	0.7 ml/min
주입량	20 μ l

표 62. Gradient elution

Time (min)	% A	% B
0	99	1
7	99	1
8	100	0
9	100	0
11	99	1
15	99	1

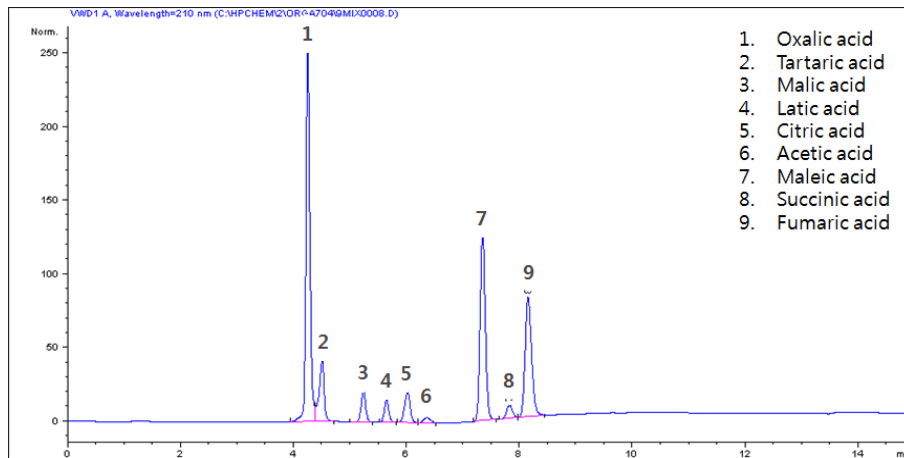


그림 222. 유기산 9종 표준용액 (100ppm) 동시분석 결과 크로마토그램.

■ 1% formic acid solution

유기산 분석은 대부분 phosphate buffer를 많이 사용하지만 buffer가 아닌 다른 산을 첨가하여 분석한 연구들도 많이 진행되어 있다. A.R.-B. de Quiros(2009)와 P. Flores(2012)는 0.1% formic acid를 이동상으로 하여 LC-MS로 동시분석 하였다. 또한, Gamoh(2003)도 0.1%와 0.5% formic acid가 첨가된 이동상을 사용하여 유기산을 분석 하였다.

본 연구실에서는 M.A. van Straten의 방법 중 20mM phosphate buffer 대신 1% formic acid가 첨가된 증류수를 사용하여 99% isocratic 방법으로 분석하였다[표 63]. 1% formic acid의 pH는 2.5로 M.A. van Straten 에서 분석된 phosphate buffer(pH

2.9)와 비슷하였다.

유기산 표준용액은 일부 변경하여 총 10종(oxalic, malic, maleic, fumaric, succinic, tartaric, citric, lactic, ascorbic, quinic acid)을 동시 분석하였다. 표준용액 100 ppm을 분석한 결과 ascorbic, maleic, fumaric acid를 제외하고 나머지 유기산 7종은 검출되지 않았다[그림 223].

표 63. 기기 분석 조건

분석기기	Agilent HP1100 series HPLC
검출기 파장	UV 210nm
컬럼	Zorbax SB-aQ (150x4.6mm, 5um)
이동상 A	1% formic acid (pH 2.5)
이동상 B	Acetonitrile
유속	1.0 ml/min
주입량	20 μ l

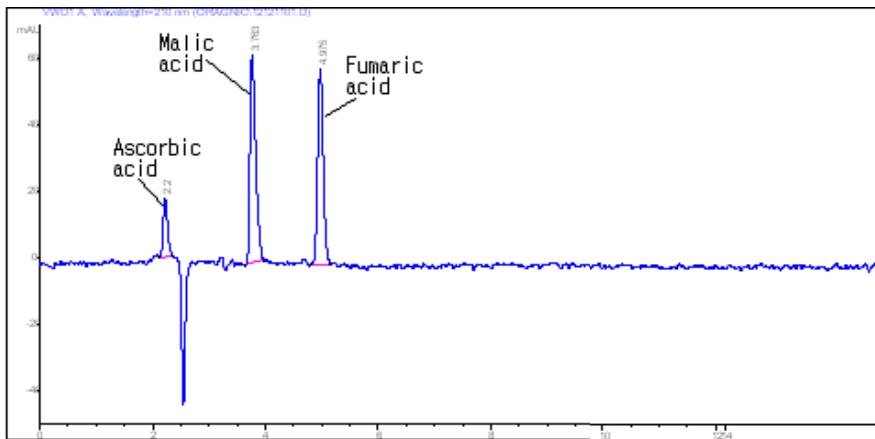


그림 223. 유기산 10종 표준용액 (100ppm) 동시분석 결과 크로마토그램.

■ 4% formic acid solution

1% formic acid가 첨가된 증류수를 이동상으로 사용하여 분석한 결과에서는 유기산 10종 중 ascorbic, maleic, fumaric acid만 검출되었다. 유기산 분석은 아니지만 anthocyanin과 같은 phenolic compound를 분석할 때 4-5% formic acid가 첨가된 증류수를 이동상으로 사용하여 HPLC로 분석한다.

Formic acid의 농도를 1%씩 올려가면서 pH를 측정해보고 pH가 2 이하로 떨어지는 %를 이동상으로 사용해 보기로 하였다. 그 결과 4% formic acid가 첨가되었을 때 pH 1.5가 되어 이 용매를 99% isocratic 방법으로 분석해보았다[표 64]. 그 결과 1% formic acid의 결과와 동일하게 유기산 3종만 나타나고 다른 유기산은 검출되지 않았다.

표 64. 기기 분석 조건

분석기기	Agilent HP1100 series HPLC
검출기 파장	UV 210nm
컬럼	Zorbax SB-aQ (150x4.6mm, 5um)
이동상 A	4% formic acid (pH 1.5)
이동상 B	Acetonitrile
유속	1.0 ml/min
주입량	20 μ l

■ 3% phosphoric acid solution

MS 분석을 위해 formic acid를 사용하는 것이 좋지만 컬럼과 이동상의 조성이 맞지 않는 것인지 ascorbic acid, maleic acid, fumaric acid를 제외한 7종의 유기산 성분은 검출되지 않았다. 다른 분석 방법을 모색하던 중 potassium phosphate buffer를 사용할 때 phosphoric acid를 이용하여 pH 2.2 ~ pH 2.9가 되도록 보정하는데 보정용액인 phosphoric acid만을 첨가하여 HPLC 분석이 가능하다. E. Kafkas(2006) 연구에서도 0.5% phosphoric acid를 사용하여 유기산을 분석하였다. A.R.—B. de Quiros(2009)에서도 일반적인 유기산 분석에 acidic mobile phase중 하나인 phosphoric acid를 LC-UV 시스템에 사용이 가능하다고 언급하고 있다. 하지만 MS 분석에서는 interface의 표면을 손상시킬 수 있기 때문에 ESI(Electro spray ionization)에는 적합하지 않다.

본 연구실에서는 3% phosphoric acid (pH 1.0)가 첨가된 증류수를 이동상으로 선택하고 컬럼 입자가 작은(3um size) ODS column으로 변경하여 유속을 0.5mL/min 흘려주고, 3% phosphoric acid를 95%로 유지하는 isocratic 방법으로 실험해보았다[표 65]. 그 결과 유기산 10종 표준용액이 모두 검출되었다. 그러나 tartaric acid와 oxalic acid가 같은 RT에 나타났고, ascorbic acid와 malic acid peak가 겹쳐있고, maleic acid와 succinic acid peak가 겹쳐 있는 것을 확인하였다[그림 224].

표 65. 기기 분석 조건

분석기기	Agilent HP1100 series HPLC
검출기 파장	UV 220nm
컬럼	YMC Pack ODS-A (250x4.6mm, 3um)
이동상 A	3% phosphoric acid (pH 1.0)
이동상 B	Acetonitrile
유속	0.5 ml/min
주입량	20 μ l

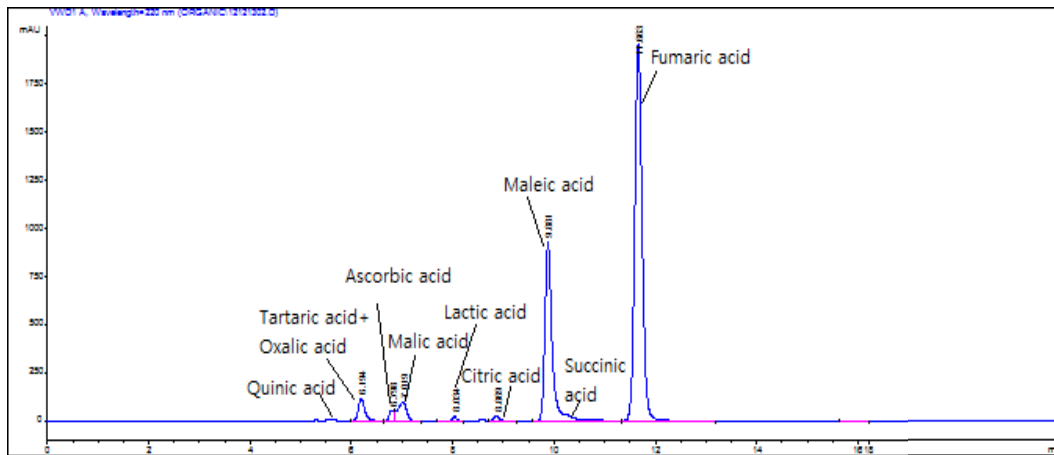


그림 224. 유기산 10종 표준용액 (100ppm) 동시분석 결과 크로마토그램.

3% phosphoric acid를 이동상으로 사용한 방법은 일부 peak들이 겹치긴 하였지만 buffer를 쓰지 않고 유기산 10종을 모두 분석할 수 있었다. 그리고 컬럼은 입자크기가 3 μ m로 더 작은 것으로 변경하면서 유속이 0.5 mL로 줄어들어 이동상의 사용량을 절감할 수 있었다. 각 유기산 성분들은 같은 농도(100 ppm)인데 각각의 peak size가 달라 농도를 달리하여 peak의 크기를 비슷한 수준으로 조절하였다. 또한 동시에 많은 유기산 성분을 분석하는 것도 중요하지만 주요 유기산을 포함하고 쉽게 분리가 가능한 성분들을 위주로 최적 분석 조건을 확립하였다.

10종의 유기산 성분들 중에서 tartaric acid, malic acid, lactic acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid 6종을 동시 분석 성분으로 선택하였다. 그리고 peak 크기에 맞게 표준용액의 농도를 조절하여 새로운 표준혼합용액을 만들었는데, tartaric acid 100 ppm, malic acid 200 ppm, lactic acid와 citric acid, succinic acid는 400 ppm 농도가 되도록 하고 fumaric acid는 가장 유기산 함량이 높아 10 ppm 수준이 되도록 하였다.

YMC Pack ODS-A 컬럼을 사용하여 유기산 6종의 표준용액을 99% A isocratic 방법으로 분석한 결과 fumaric acid를 제외하고 다른 5종의 peak 크기는 비슷하게 나타났다. 그리고 6종의 유기산 성분들 모두 겹침 없이 분리가 잘 된 것을 확인하였다[표 66, 그림 225].

표 66. 기기 분석 조건

분석기기	Agilent HP1100 series HPLC
검출기 파장	UV 220nm
컬럼	YMC Pack ODS-A (250x4.6mm, 3 μ m)
이동상 A	3% phosphoric acid (pH 1.0)
이동상 B	Acetonitrile
유속	0.5 ml/min
주입량	20 μ l

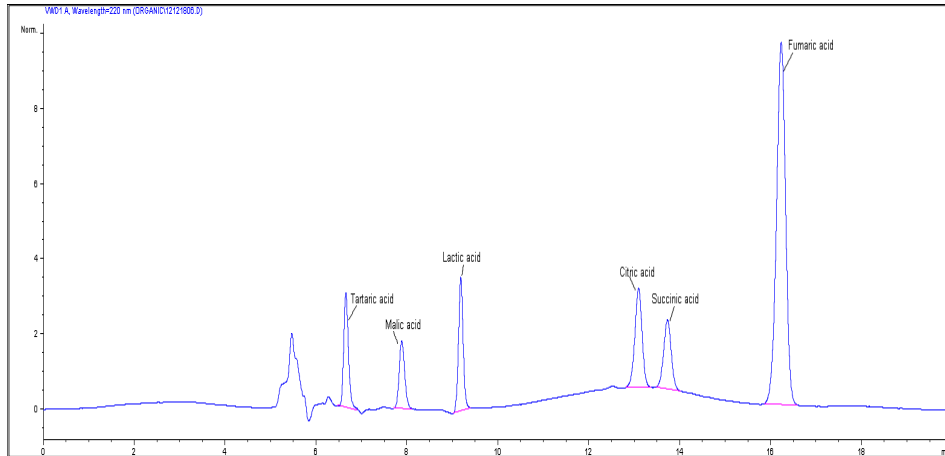


그림 225. 유기산 6종 표준용액 동시분석 결과 크로마토그램.

㉔ 결론

HPLC를 이용한 유기산 성분 분석조건 확립을 위해 이동상의 조성을 변경해보고, 컬럼의 종류를 변경하여 비교실험을 하였다. 그 결과 tartaric acid, malic acid, lactic acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid로 총 6종의 유기산 성분을 동시분석 할 수 있는 분석조건을 확립하였다.

분석 컬럼은 YMC Pack ODS-A (250 x 4.6mm, 3um) 컬럼을 사용하고, 이동상은 3% phosphoric acid(pH 1.0)와 acetonitrile 비율이 99 : 1이 되도록 isocratic 상태를 유지하였다. 유속은 분당 0.5 mL이고 UV 파장 220 nm에서 분석하였다.

③ 시료 추출 방법 확립

※ 유기산은 주로 물 추출 방법이 사용되고 있다. 100% 물을 이용하여 상온 추출 하거나 (Tormo, 2004; P. Flores, 2012) 이동상으로 사용되는 phosphate buffer, phosphoric acid 로 추출하는 방법(E. Kafkas, 2006; Y.W. Park, 2006)도 있다. 그러나 SPE cartridge를 이용한 정제과정이 있어 시간이 오래 걸리는 단점이 있다.

본 연구실에서는 정제과정 없이 쉽고 간단하게 추출 가능한 방법들 중에서 C.D. Broeckling(2005)의 방법을 일부 변경하여 유기산 분석을 위한 최적 추출 조건을 확립하였다.

※ 시료는 캠벨포도를 구입하여 믹서로 갈아 냉동 보관 후 사용하였다.

※ 각각의 시료를 1 g씩 취해 50 mL tube에 담고 증류수를 10 mL씩 부은 뒤 240 rpm에서 10분 동안 추출해주었다. 추출물에 chloroform을 10 mL씩 첨가 후 240 rpm에서 10분 동안 혼합하고, 50 °C에서 30분간 반응시켰다. 추출물을 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다[그림 226].

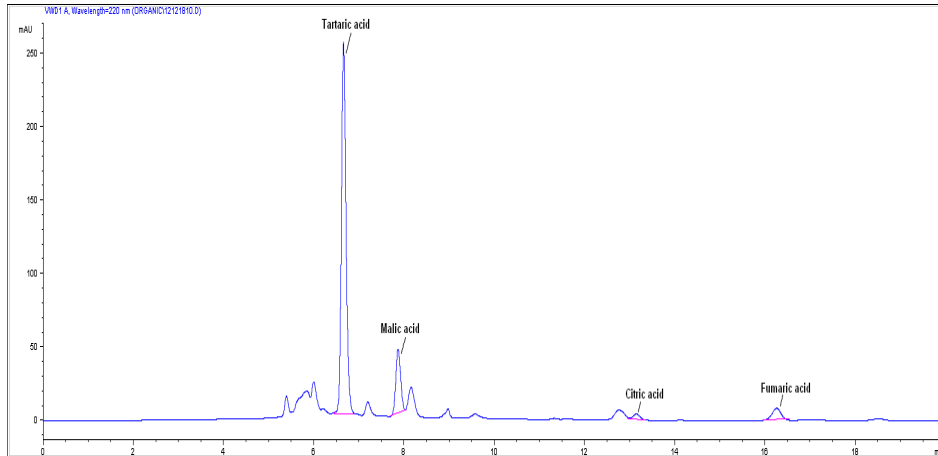


그림 226. 포도(캠벨)추출물의 분석 결과 크로마토그램

(다) 분석법 검증

※ 유기산의 직선성을 확인하여 분석방법의 유효성을 확인하였다.

① 표준용액 제조

유기산 중 succinic acid, lactic acid, citric acid는 각 10 mg을 증류수 5 mL에 녹여 2000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였고, tartaric acid, malic acid, fumaric acids는 5 mg을 증류수 5 mL에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 그리고 fumaric acid는 stock solution을 100 ppm으로 희석하여 사용하였다. Tartaric acid와 malic acid는 1000 ppm 농도의 표준용액을 각각 100 μ l 취하고, succinic acid, lactic acid, citric acid는 2000 ppm 농도의 표준용액을 각각 200 μ l를 취하고, fumaric acid는 100 ppm 농도를 100 μ l 취하여 혼합표준용액(working solution)을 제조하였다. 이 표준용액을 5단계로 희석하여 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 결과를 확인하였다[그림 227].

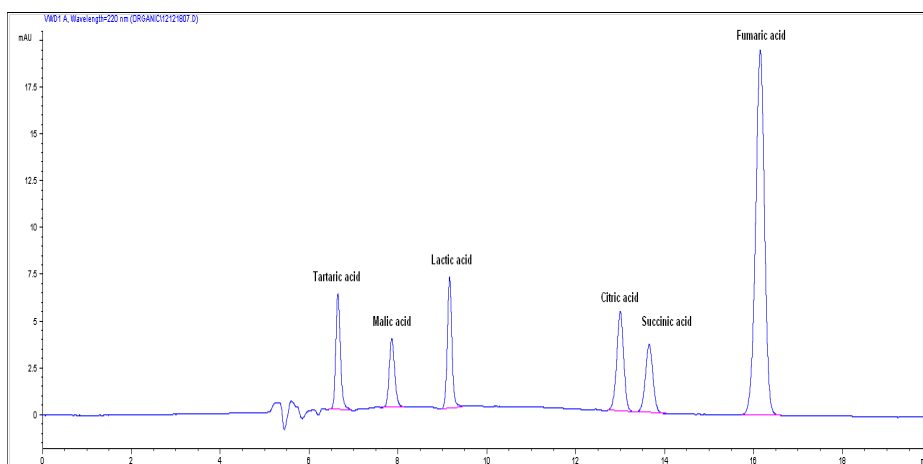


그림 227. 유기산 6종 표준용액 분석 결과 크로마토그램

② 표준용액 검량선의 직선성

유기산 표준용액 level 1 ~ level 5까지 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여

chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[표 67, 그림 228-233]. 유기산 표준용액을 분석하여 얻은 검량선은 $R^2=0.999$ 이상으로 직선성이 우수함을 확인하였다[표 68].

표 67. 유기산 6종 표준용액 농도 (단위: ppm)

유기산 종류	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Tartaric acid	6.25	12.5	25	50	100
Malic acid	12.5	25	50	100	200
Lactic acid	25	50	100	200	400
Citric acid	25	50	100	200	400
Succinic acid	25	50	100	200	400
Fumaric acid	0.625	1.25	2.5	5	10

표 68. 유기산 표준용액의 검량선 및 직선성

유기산 종류	Calibration range (ug/mL)	Calibration curve	R^2
Tartaric acid	6.25 - 100	$y = 3.4885x + 1.4792$	0.999
Malic acid	12.5 - 200	$y = 1.2222x + 1.1583$	0.999
Lactic acid	25 - 400	$y = 1.1263x + 3.1667$	0.999
Citric acid	25 - 400	$y = 1.0137x - 3.4708$	0.999
Succinic acid	25 - 400	$y = 0.8399x + 1.8083$	0.999
Fumaric acid	0.625 - 10	$y = 216.58x$	1.000

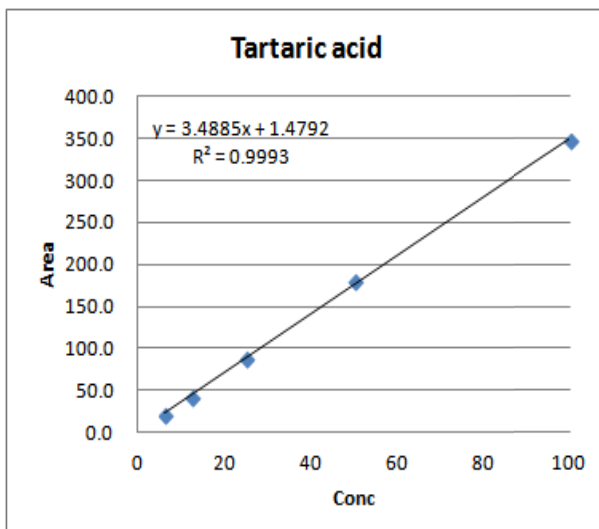


그림 228. Tartaric acid 표준용액 검량선

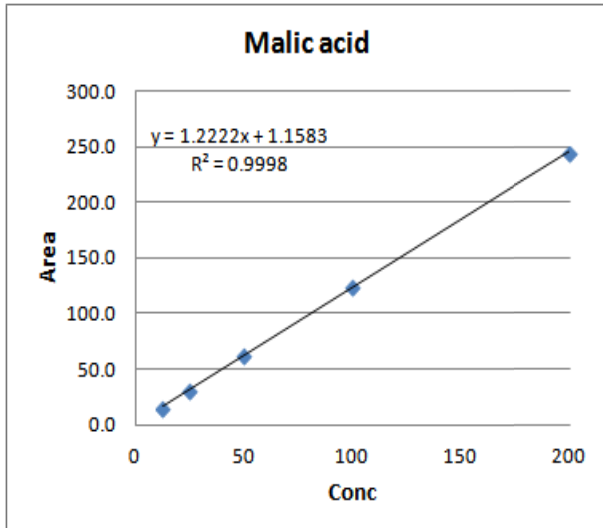


그림 229. Malic acid 표준용액 검량선

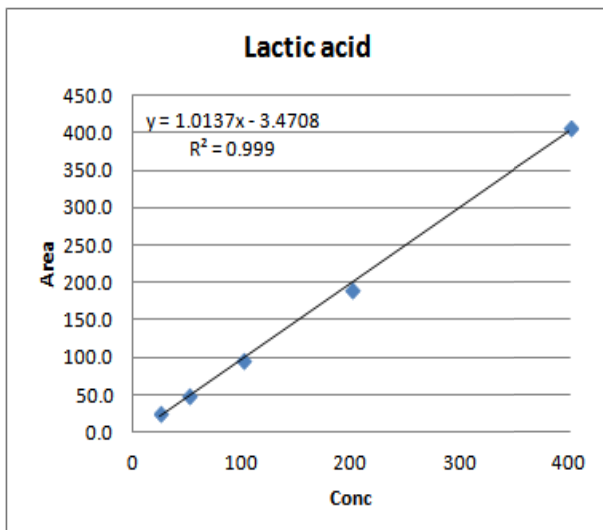


그림 230. Lactic acid 표준용액 검량선

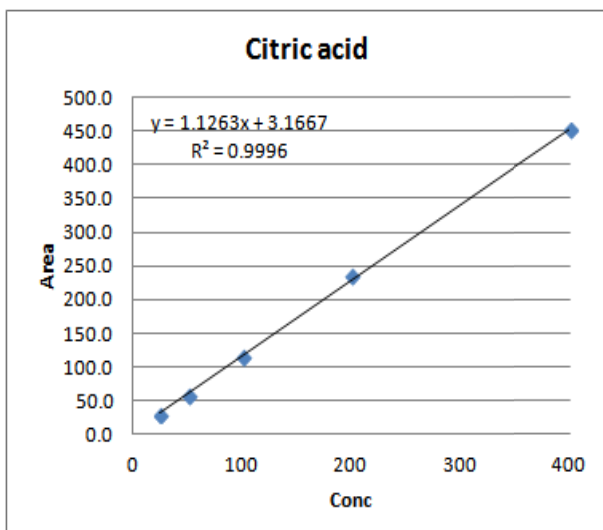


그림 231. Citric acid 표준용액 검량선

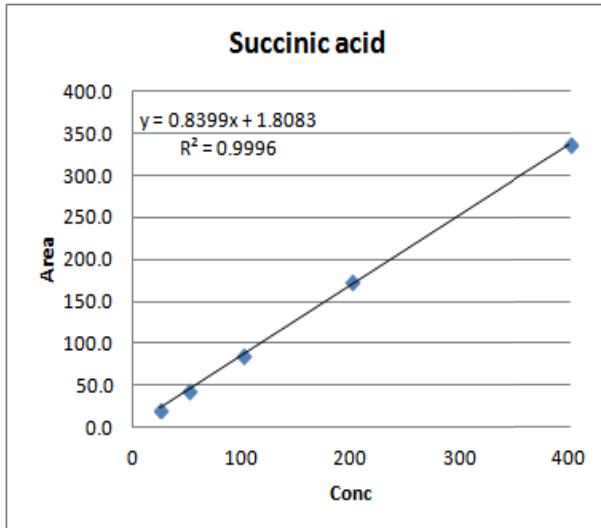


그림 232. Succinic acid 표준용액 검량선

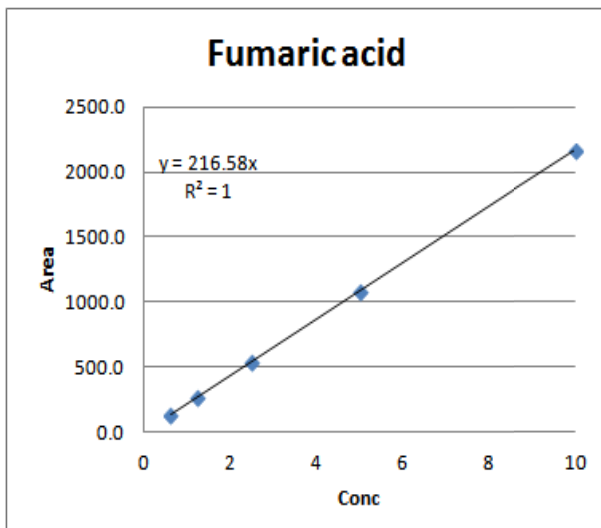


그림 233. Fumaric acid 표준용액 검량선

(라) 작물 시료의 유기산 분석 및 결과

※ 확립/검증된 분석법을 이용하여 포도, 사과, 감귤의 유기산 6종 성분을 동시 분석하였다.

① 시료의 분석 조건

- 분석기기: Agilent HP1100 series
- 검출기: UV detector (Wavelength : 220 nm)
- 컬럼: YMC-Pack ODS-A column (250 × 4.6 mm, 3 μm)
- 컬럼 오븐 온도: 35 °C
- 이동상
 - Solvent A : Acetonitrile
 - Solvent B : DW + 3% phosphoric acid (pH 1.0)
 - 99% B isocratic elution method

- 유속: 0.5 mL/min
- 주입량: 20 μ l

② 시료 추출 조건

포도, 사과, 감귤 시료를 각각 1 g 측정하고 3차 증류수를 10 mL씩 부은 뒤 240 rpm에서 10분 동안 혼합해주었다. 추출물에 chloroform(HPLC grade)를 10 mL씩 첨가 후 240 rpm에서 10분간 혼합하고 50 °C water bath에서 30분간 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 한 후 상층액을 0.45 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다. 모든 시료는 3번 반복하여 추출하였다.

③ 시료 분석 결과

■ 시료별 유기산 함량(ug/g)

포도, 사과, 감귤의 유기산 함량을 분석한 결과 총 유기산 함량은 감귤>포도>사과 순으로 높게 나타났다[표 69]. 각 유기산 성분별로 비교해보면 tartaric acid는 포도>감귤>사과 순으로 높게 나타나고, malic acid는 포도>사과>감귤, citric acid는 감귤>포도>사과, fumaric acid는 사과>감귤>포도 순으로 나타났다. Lactic acid와 succinic acid는 모두 검출되지 않았다. 과일별로 유기산 함량이 높은 순서로 비교해보면 사과는 malic acid>citric acid>fumaric acid>tartaric acid 순으로 높게 나타나고, 감귤은 citric acid>malic acid>tartaric acid, 포도는 tartaric acid>malic acid>citric acid 순서로 나타났다. 이 결과는 국립농업과학원에서 제시한 주요 구성 성분 결과와 일치하였다. 다만 사과에서는 fumaric acid가 추가로 확인되었고, 포도는 citric acid 함량이 감귤보다는 적지만 사과보다 높은 것을 알 수 있었다. 그리고 감귤에서는 citric acid가 가장 많이 존재하지만 malic acid와 tartaric acid도 검출된 것을 확인하였다.

시료의 유기산 분석 결과 크로마토그램을 보면 6종 이외의 다른 유기산 성분들이 존재하는 것을 추측 할 수 있었다[그림 234-236]. 특히 감귤의 경우 큰 unknown peak가 두 개 나타났는데 그 중 하나는 ascorbic acid로 추측된다. H. Kelebek(2009)의 연구 결과에 따르면 HPLC로 오렌지 주스를 분석한 결과 malic acid와 비슷한 retention time에 ascorbic acid가 검출되었다. 다른 연구 결과에서도 감귤에 존재하는 기능성 성분들 중에 citric acid과 함께 ascorbic acid가 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

표 69. 시료별 유기산 함량 결과 (단위 : ug/g)

	사과	감귤	포도
Tartaric acid	51.0 ± 5.8 (11.5)*	144.5 ± 8.2 (5.7)	4833.8 ± 533.3 (11.0)
Malic acid	2273.0 ± 248.1 (10.9)	258.6 ± 7.0 (2.7)	2500.8 ± 369.5 (14.8)
Lactic acid	ND**	ND	ND
Citric acid	221.0 ± 32.3 (14.6)	15534.2 ± 267.2 (1.7)	465.5 ± 17.2 (3.8)
Succinic acid	ND	ND	ND
Fumaric acid	128.2 ± 6.1 (4.7)	3.4 ± 0.7 (19.4)	ND
총 유기산 함량	2546.3 ± 283.6 (11.1)	15940.8 ± 267.3 (1.7)	7791.1 ± 907.7 (11.7)

* 3반복 평균 유기산 함량 ± 표준편차 (상관계수, %)

** ND: Not detectable

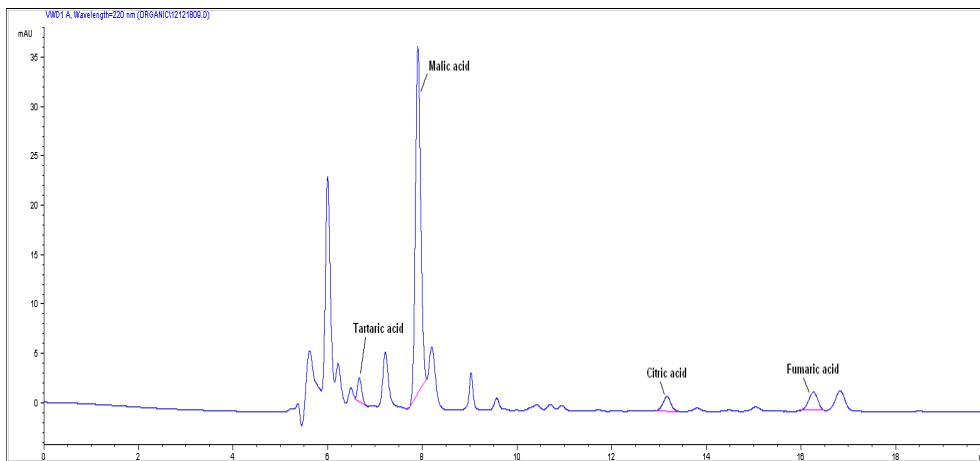


그림 234. 사과의 유기산 분석 결과 크로마토그램

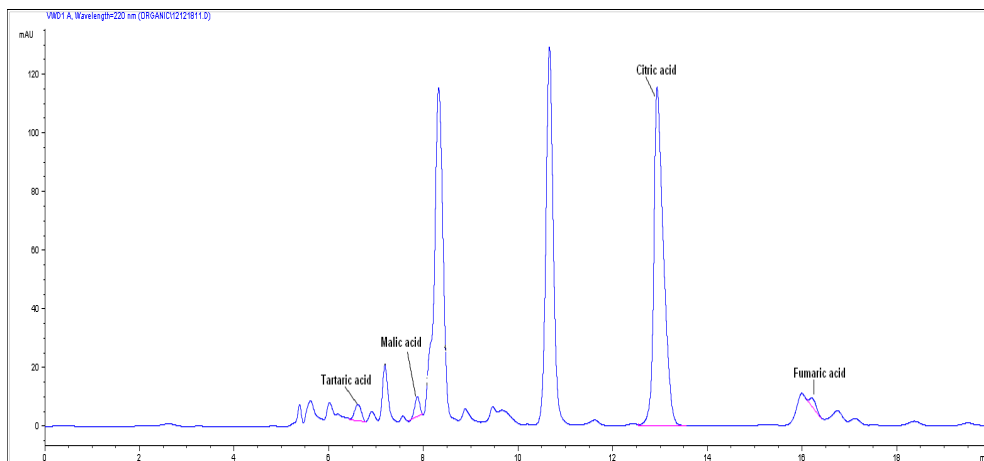


그림 235. 감귤의 유기산 분석 결과 크로마토그램

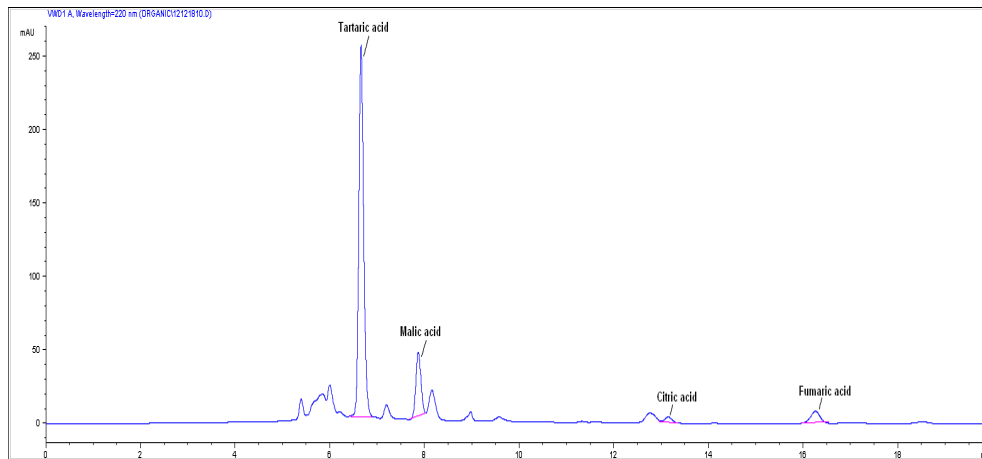


그림 236. 포도의 유기산 분석 결과 크로마토그램

(마) 결론

본 연구실에서는 HPLC를 이용한 유기산 6종의 동시분석기술을 확립하고 포도, 사과, 감귤 시료에 적용하여 분석법의 활용성을 증명하였다. 유기산의 종류는 각 성분별로 분석할 경우 10종을 모두 분석 가능하지만, peak가 겹쳐 분리가 쉽지 않은 성분들은 동시 분석하는데 어려움이 있다.

최근 metabolomics 분석이 많이 이루어지고 있는데 유도체화 과정을 통한 GC-MS 분석 기술을 이용하면 약 40여종의 유기산 분석이 가능하다. 향후 metabolomics 분석을 위한 유기산 다성분 동시 분석법을 확립하고 작물 중 과일위주의 새로운 유기산을 찾기 위한 연구를 진행할 계획이다.

마. 인삼, 오가피 시료의 기능성 성분인 ginsenoside와 eleutheroside 동시분석 기술 개발

(1) 인삼의 기능성 성분인 ginsenoside 15종 동시 분석기술 확립

(가) Ginsenosides

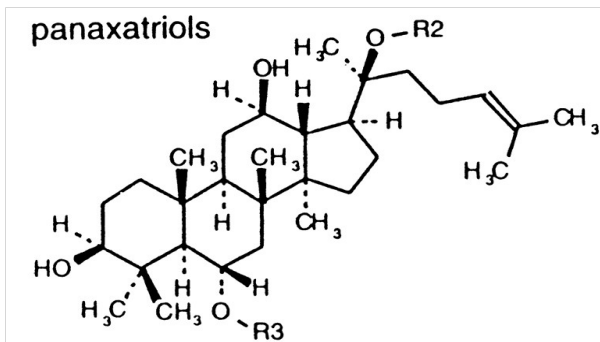


그림 237. Panaxatriol saponin 구조

Protopanaxadiol saponin	R2	R3	form
Ginsenoside-Re	-glc(2→1)rha	-glc	
Ginsenoside-Rf	-glc(2→1)glc	-H	
Ginsenoside-Rg1	-glc	-glc	
Ginsenoside-Rg2	-glc(2→1)rha	-H	20(S), 20(R)
Ginsenoside-Rh1	-glc	-H	20(S), 20(R)

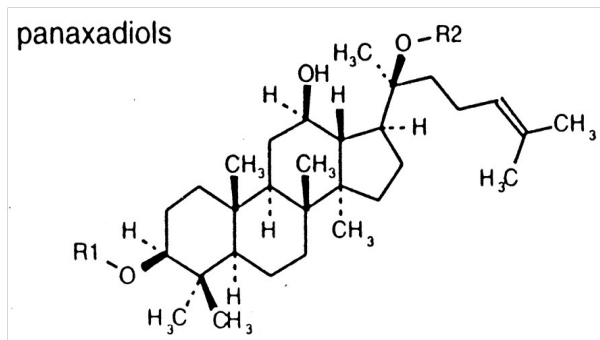


그림 238. Panaxadiol saponin 구조

Protopanaxadiol saponin	R2	R3	form
Ginsenoside-Rb1	-glc(2→1)glc	-glc(6→1)glc	
Ginsenoside-Rb2	-glc(2→1)glc	-glc(6→1)arap	
Ginsenoside-Rc	-glc(2→1)glc	-glc(6→1)araf	
Ginsenoside-Rd	-glc(2→1)glc	-glc	
Ginsenoside-Rg3	-glc(2→1)glc	-H	20(S), 20(R)
Ginsenoside-Rh2	-glc(2→1)glc	-H	20(S), 20(R)

(나) Ginsenosides 분석법 확립

※ 본 연구에서는 인삼의 생리활성 물질인 ginsenoside 15종(Re, Rg1, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rg2S, Rg2R, Rh1S, Rh1R, Rd, Rg3S, Rg3R, Rh2S, Rh2R)의 동시분석법을 확립하였다 [그림 239, 240].

인삼에 함유된 ginsenoside 성분을 분석하기 위하여 Park 등(2013)의 방법을 참고하여 분석 조건을 확립하였다.

① Ginsenoside 표준용액 확인

㉞ 표준용액 제조

Ginsenoside 표준품 15종(순도 98% 이상)은 엠보연구소에서 구입하여 사용하였다. Ginsenoside 표준품 14종을 각각 5 mg 취해 100% methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Rg3R은 5 mg 취해 DMSO 200 μ l에 녹인 후 100% methanol 25 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 각 stock solution을 혼합하여 100 ppm working solution mixture를 만들고 methanol로 단계별로 희석하여 50, 20, 10, 5, 1 ppm 용액을 조제하였다[그림 233].

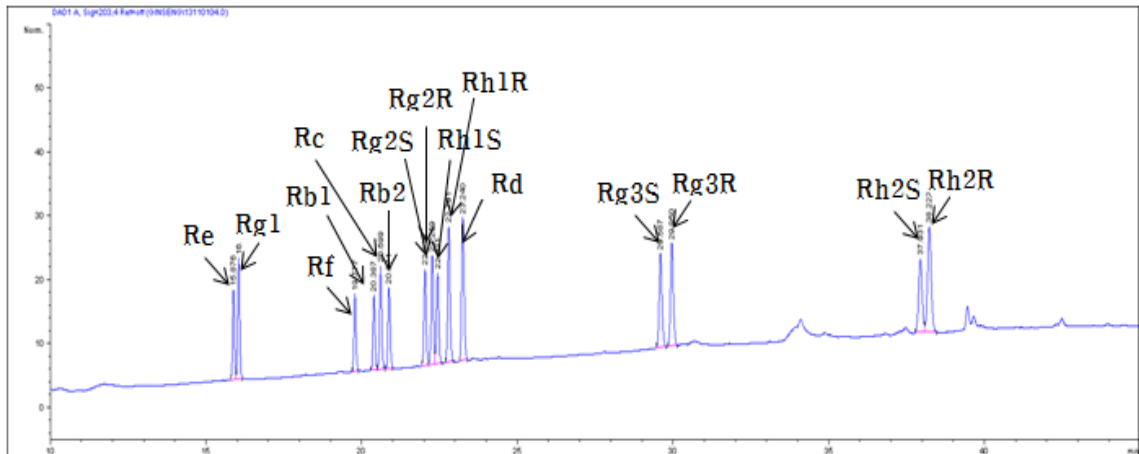


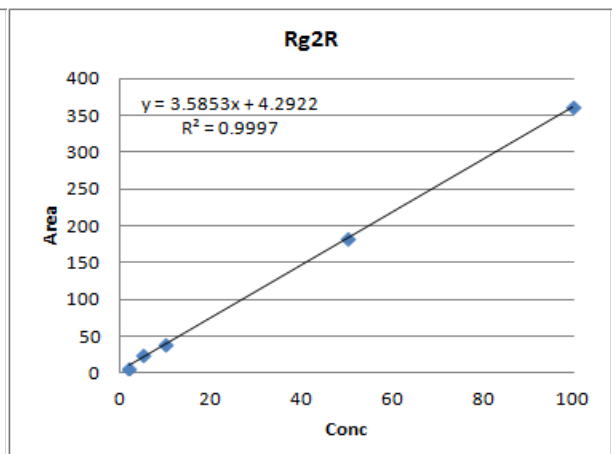
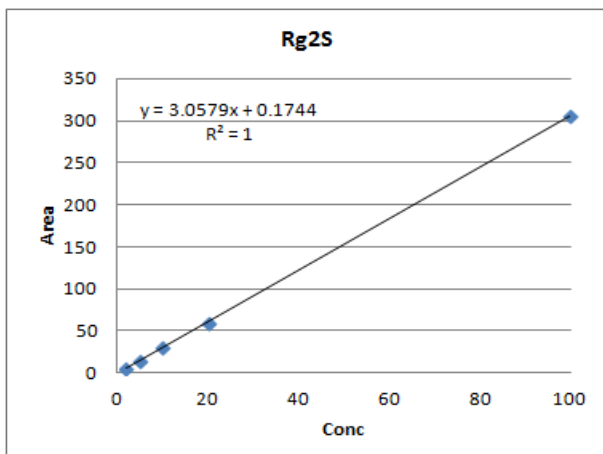
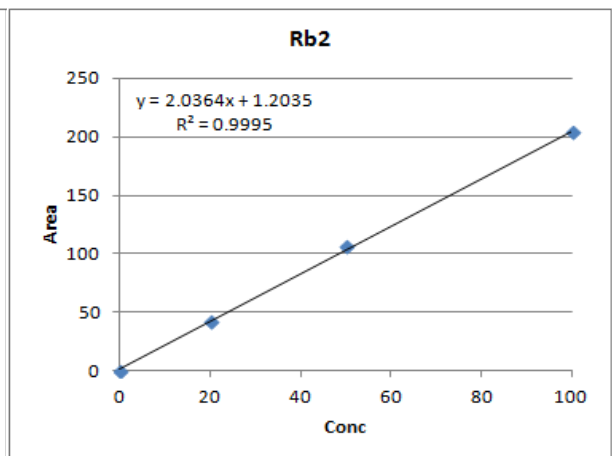
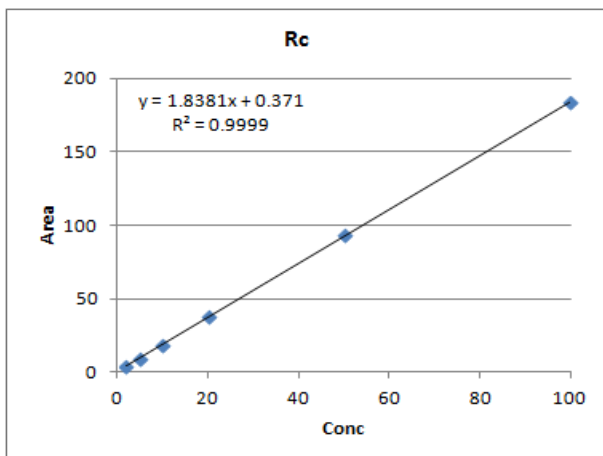
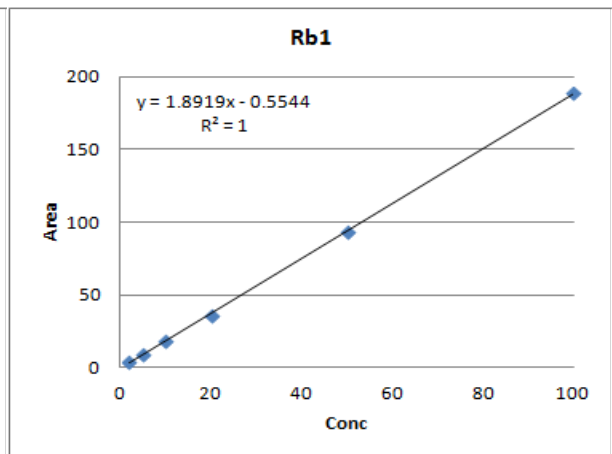
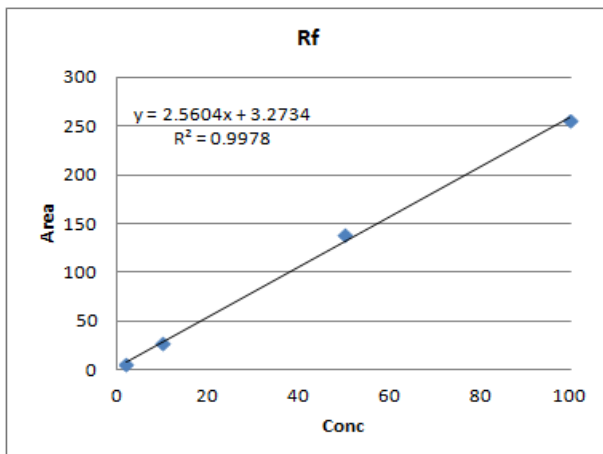
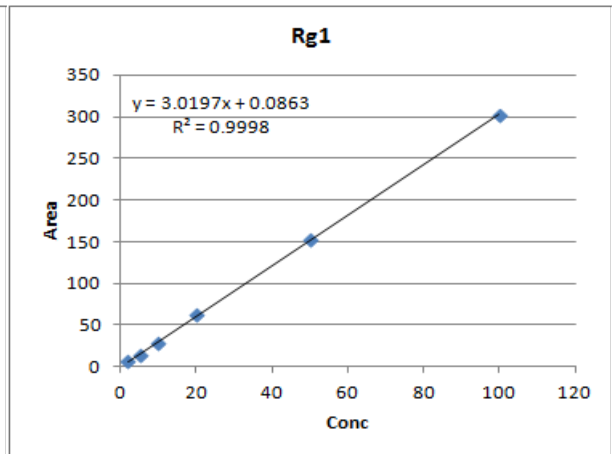
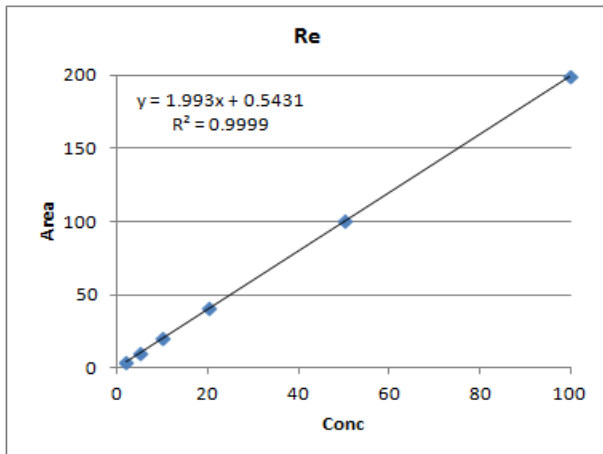
그림 239. Ginsenoside 15종의 표준용액 (5 ppm) 분석 결과 크로마토그램

㉞ 표준용액 검량선

Ginsenoside 15종 표준용액을 2 ~ 100 ppm 농도 범위에서 5 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다. Ginsenoside 표준용액을 분석하여 얻은 검량선은 $R^2=0.999$ 이상으로 직선성이 우수함을 확인하였다[표 70, 그림 240].

표 70. Ginsenoside 표준용액의 검량선 및 직선성

Analytes	Calibration curve	R^2
Re	$y=1.993x+0.5431$	0.9999
Rg1	$y=3.0197x+0.0863$	0.9998
Rf	$y=2.5604x+3.2734$	0.9978
Rb1	$y=1.8919x-0.5544$	1
Rc	$y=1.8381x+0.371$	0.9999
Rb2	$y=2.0364x+1.2035$	0.9995
Rg2S	$y=3.0579x+0.1744$	1
Rg2R	$y=3.5853x+4.2922$	0.9997
Rh1S	$y=3.5687x-2.048$	0.9997
Rh1R	$y=3.9358x-2.1622$	0.9998
Rd	$y=2.3327x+0.8585$	0.9997
Rg3S	$y=3.1266x-1.8579$	0.9999
Rg3R	$y=3.662x+3.643$	0.9999
Rh2S	$y=3.1409x-0.0148$	0.9996
Rh2R	$y=4.6126x+11.195$	0.9984



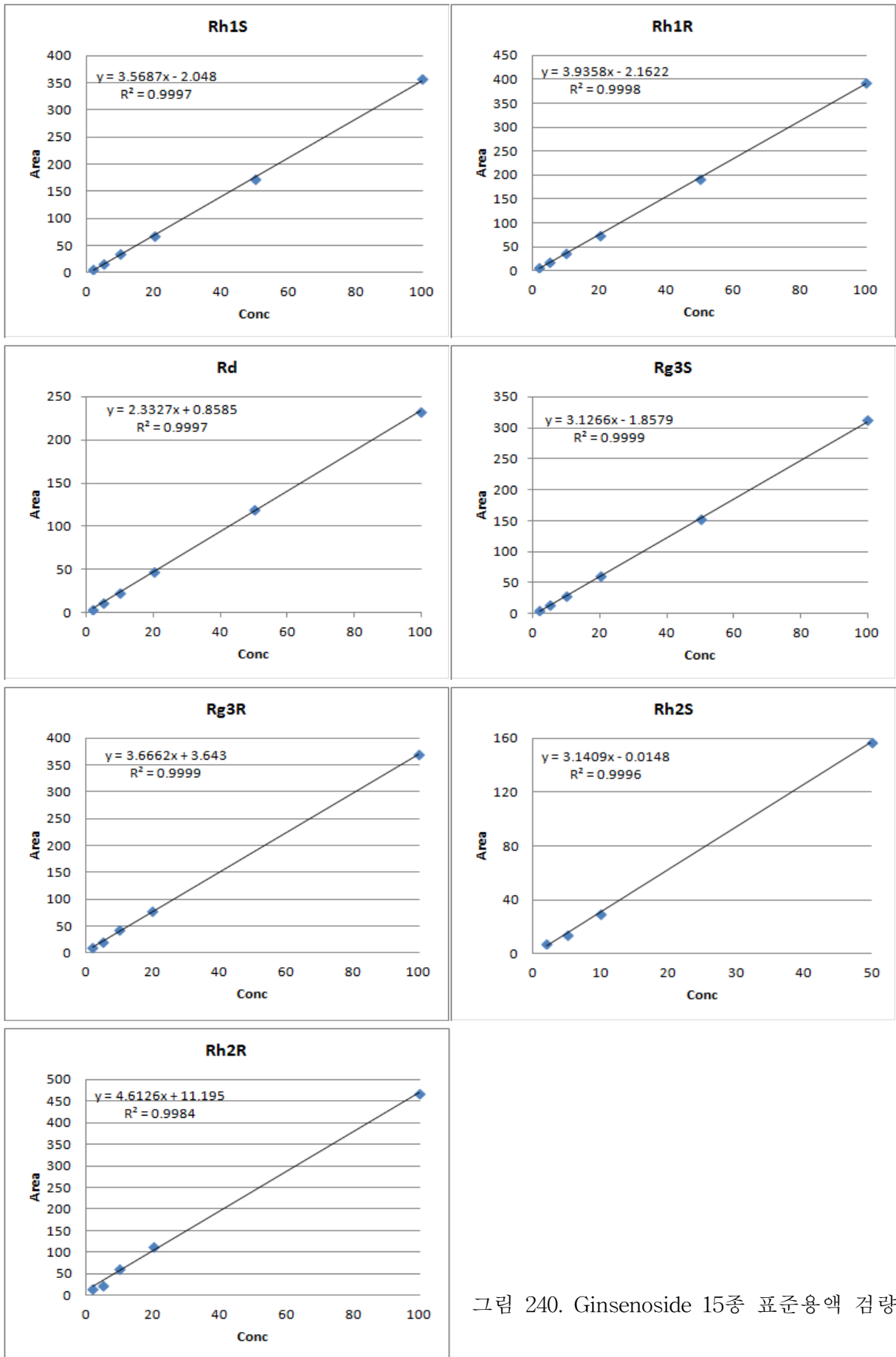


그림 240. Ginsenoside 15종 표준용액 검량선

② Ginsenoside 분석을 위한 조건 확립

Ginsenoside 분석에는 HPLC-UV와 HPLC-ELSD 방법을 가장 많이 사용하고 있다. FLD를 이용할 수 있으나 ginsenosides에는 적합한 형광 발생단이 없어 FLD로 분석할 경우 유도체화 하여 분석해야 하는 단점이 있다.

본 연구실에서는 HPLC-UV와 HPLC-ELSD를 모두 이용하여 분석해보았을 때, ELSD는 감도가 낮고 일부 성분들이 검출되지 않아 HPLC-UV를 이용하여 최적 분석 조건을 확립하였다.

㉞ 기기 분석 조건

- Instrument : Agilent 1100 HPLC
- Detector : UVD (Wavelength: 203 nm)
- Column : Gemini NX C18 (250x4.6mm, 3 μ m)
+ Gemini NX C18 (150x4.6mm, 3 μ m)
- Mobile phase
 - Solvent A : Water
 - Solvent B : Acetonitrile
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	80	20
2	80	20
42	0	100
47	0	100
50	80	20
60	80	20

- Flow rate : 0.7 ml/min
- Injection volume : 5 μ l

㉞ 시료 추출 방법

분쇄한 인삼 0.5 g에 70% methanol 10 ml를 가하고 ultrasonic cleaner에서 30분 동안 초음파 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μ m RC syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 5 μ l씩 주입하여 HPLC로 분석하였다. 시료는 2-3반복 추출하여 사용하였다.

③ 시료 분석 결과

인삼 시료 3종류를 70% methanol 추출하여 분석한 결과 크로마토그램은 다음과 같다 [표 72, 그림 241]. 그 결과 3개 시료에서 ginsenoside 함량은 공통적으로 Re가 가장 많았다. 그 다음으로 Rf과 Rb1의 함량이 전체 함량 중 높게 나타난 편이었다. 시료별로 각 성분별 함량 결과는 다르게 나타났다. 그리고 ginsenoside 15종 중에서 Rd, Rg2R, Rh1R, Rg3S는 검출되지 않았다. 전체적인 함량은 각각 9142.8 ug/mL, 10999.1 ug/mL, 10950.2 ug/mL로 1의 함량이 조금 적게 나타나고, 2와 3의 함량은 비슷한 수준을 나타내었다.

표 72. 인삼 시료 분석결과 크로마토그램 (단위: ug/mL)

Ginsenosides	Sample 1		
	Average	STDEV	C.V.(%)
Re	3604.8	21.3	0.6
Rg1	904.2	12.2	1.3
Rf	1069.8	63.0	5.9
Rb1	1057.2	43.4	4.1
Rc	664.4	9.2	1.4
Rb2	682.5	68.1	10.0
Rg2S	477.8	29.6	6.2
Rh1S	355.8	33.3	9.4
Rg3R	97.2	17.7	18.3
Rh2S	160.0	4.5	2.8
Rh2R	69.0	4.0	5.8
Total ginsenosides	9142.8		

Ginsenosides	Sample 2		
	Average	STDEV	C.V.(%)
Re	4088.4	438.5	10.7
Rg1	1195.0	106.8	8.9
Rf	1567.4	218.7	14.0
Rb1	1189.4	152.5	12.8
Rc	738.3	55.4	7.5
Rb2	846.5	72.2	8.5
Rg2S	463.4	62.9	13.6
Rh1S	390.0	73.7	18.9
Rg3R	84.6	13.9	16.4
Rh2S	331.3	32.4	9.8
Rh2R	104.7	8.7	8.4
Total ginsenosides	10999.1		

Ginsenosides	Sample 3		
	Average	STDEV	C.V.(%)
Re	3405.7	61.4	1.8
Rg1	1818.0	24.5	1.3
Rf	1358.0	35.2	2.6
Rb1	1131.6	12.2	1.1
Rc	884.2	41.5	4.7
Rb2	788.3	4.5	0.6
Rg2S	410.6	69.5	16.9
Rh1S	492.6	9.7	2.0
Rg3R	80.3	0.0	0.0
Rh2S	459.9	0.0	0.0
Rh2R	121.0	3.8	3.2
Total ginsenosides	10950.2		

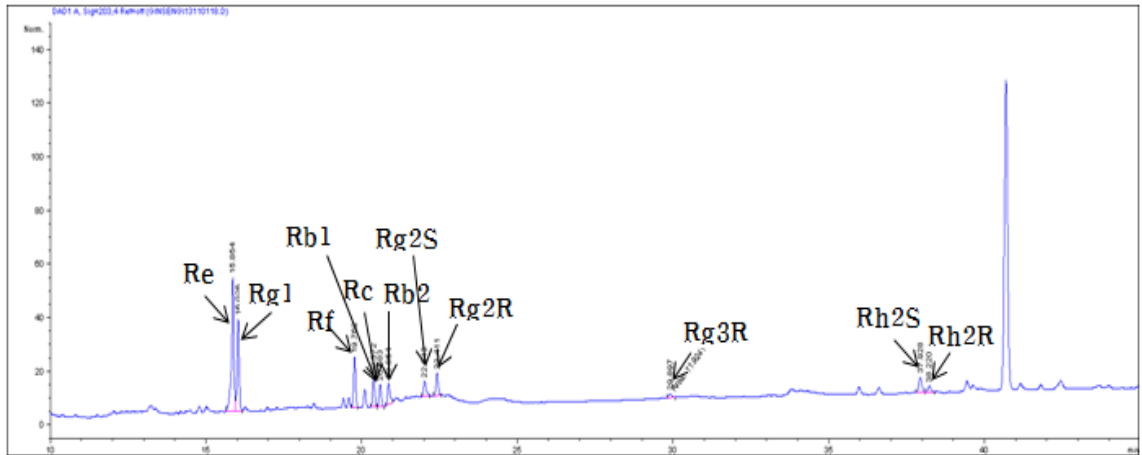
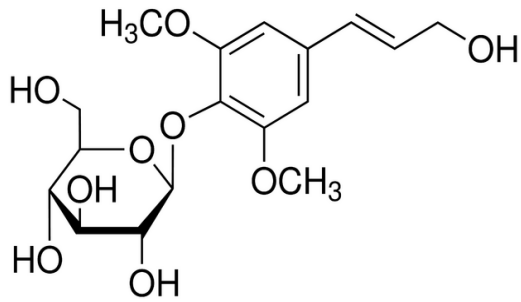


그림 241. 인삼 70% methanol 시료 분석 결과 크로마토그램

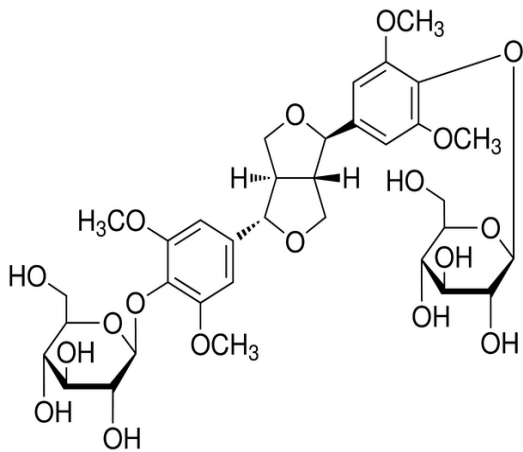
③ 결론

본 연구실에서는 HPLC-UV를 이용하여 인삼의 기능성/생리활성 성분인 ginsenoside 15종의 동시 분석 조건을 확립하였다. Gemini NX C18 컬럼 2 종류를 연결하여 기울기 용매법을 사용, 최적 분리 조건을 확립하고, 표준용액과 시료에서 ginsenoside 15종 분석 결과를 통해 분석 방법의 유효성을 확인하였다.

(2) 오가피의 기능성 성분인 eleutheroside 동시 분석기술 확립



Eleutheroside B



Eleutheroside E

※ 본 연구에서는 오가피의 기능성 성분으로 알려진 eleutheroside B와 eleutheroside E 성분의 동시분석법을 확립하였다. 오가피에 함유된 eleutheroside 성분을 분석하기 위하여 Feng, S. (2006), Ma, Y. (2011), Yang, L et al. (2013) 방법을 참고하였다.

(가) Eleutheroside 표준품의 분석 조건 확립

※ Eleutheroside B와 E의 표준용액 제조

Eleutheroside B 표준품 5 mg을 100% methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Eleutheroside E 표준품은 5 mg에 60% methanol 5ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 각 stock solution을 동량으로 혼합하여 100 ppm working solution mixture를 만들고 70% methanol로 단계별로 희석하여 10, 5, 1 ppm 용액을 조제하여 사용하였다.

① 실험 I - I. 시료 주입량 확인

㉞ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : HP1100 series
- Detector : Variable wavelength detector (Wavelength; 220nm)
- Column : Kinetex C18 column (150 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Acetonitrile

- Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
13	10	90
15	10	90
18	90	10
20	90	10

- Flow rate : 0.8 ml/min
- Injection volume : 10 μ l

㉔ 표준용액 분석 결과

Eleutheroside 표준혼합용액과 표준용액을 각각 분석한 결과 eleutheroside B는 fronting 현상이 나타나고, E는 peak가 2개로 갈라져 나타난 것을 확인하였다[그림 242-244]. 시료 주입량이 10 μ l로 많아서 overload 된 것으로 판단되어 시료 주입량을 5 μ l로 낮춰서 다시 한 번 확인해보았다.

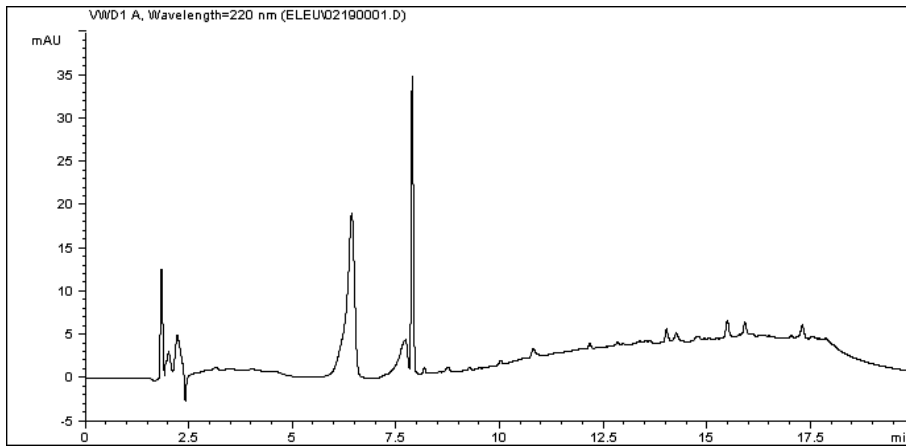


그림 242. Eleutheroside 표준혼합용액(5ppm)의 크로마토그램

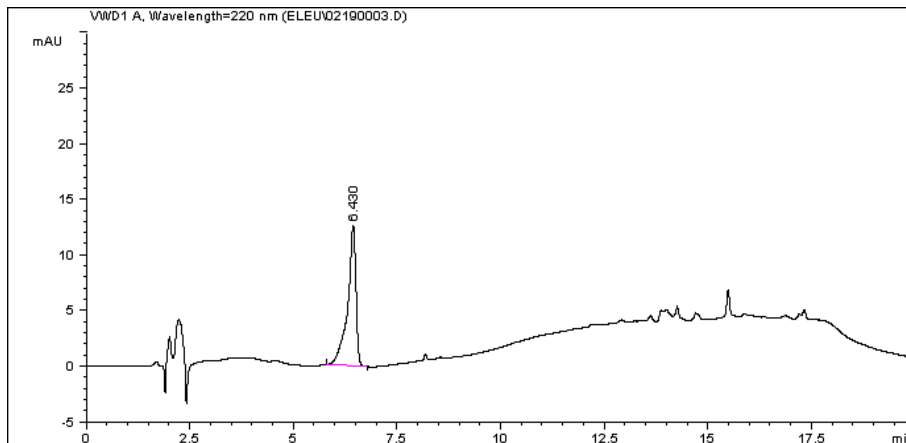


그림 243. Eleutheroside B 표준용액(5ppm)의 크로마토그램

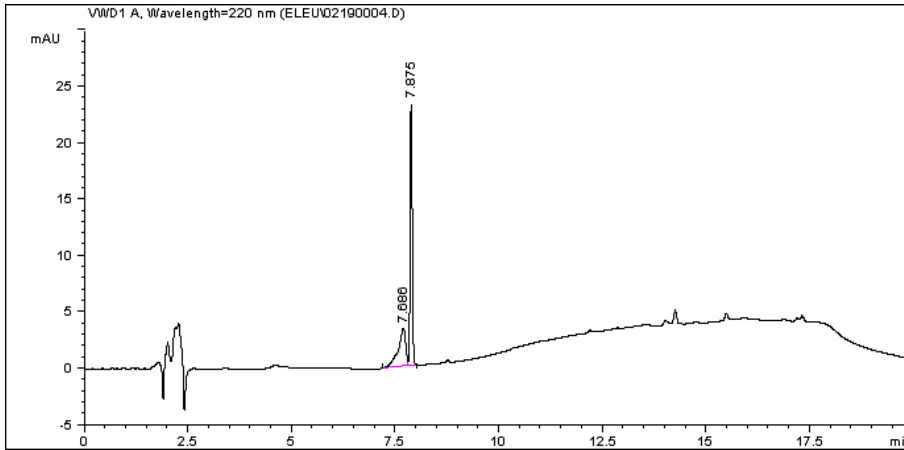


그림 244. Eleutheroside E 표준용액(5ppm)의 크로마토그램

㉔ 시료 주입량을 5 μ l로 변경 후 표준용액 분석 결과

Eleutheroside 표준혼합용액의 시료 주입량을 5 μ l로 낮춰서 분석한 결과 eleutheroside B와 eleutheroside E의 peak 모양이 개선된 것을 확인하였다[그림 245].

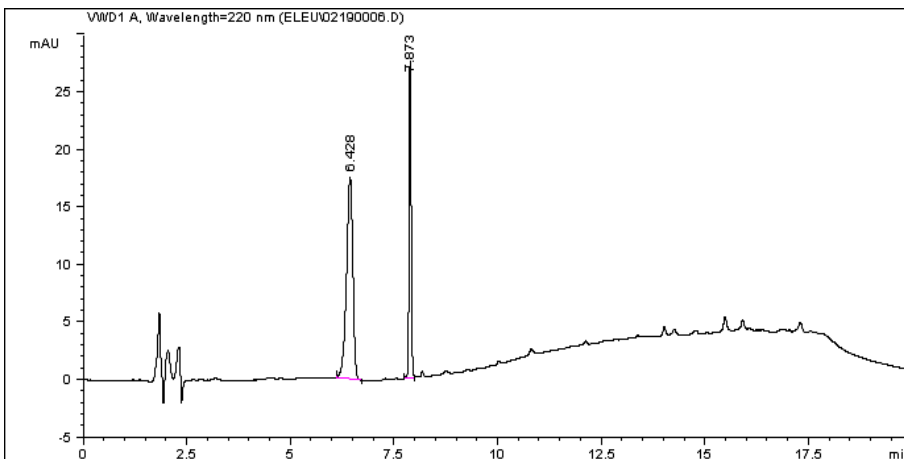


그림 245. Eleutheroside 표준혼합용액(5ppm)의 크로마토그램

② 실험 I - II. 이동상의 기울기 조건 변경

분석 시료에 unknown peak가 많을 경우 peak가 겹쳐서 나타나기도 한다. Unknown peak가 많이 겹쳐있으면 정량분석이 어렵기 때문에 이동상의 기울기 조건을 변경하여 peak가 분리될 수 있는 최적조건을 실험해보았다.

㉔ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : HP1100 series
- Detector : Variable wavelength detector (Wavelength; 220nm)
- Column : Kinetex C18 column (150 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Acetonitrile

- Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
13	50	50
15	50	50
18	90	10
20	90	10

- Flow rate : 0.8 ml/min
- Injection volume : 5 μ l

㉞ 표준용액 분석 결과

Eleutheroside 표준혼합용액을 분석한 결과 eleutheroside B는 6.433분, E는 8.906분에 각각 나타난 것을 확인하였다[그림 246]. 90% DW에서 50% DW로 변경되는 조건을 30%-70% DW로 나뉘서 증가시키거나 40%-90% DW로 증가시켜보았을 때 오히려 peak 간격이 줄어드는 것을 확인하였다(Data not shown). 표준혼합용액 상태에서는 50% DW로 변경되는 조건이 최적상태로 판단되어 시료 결과를 함께 비교해보기로 하였다.

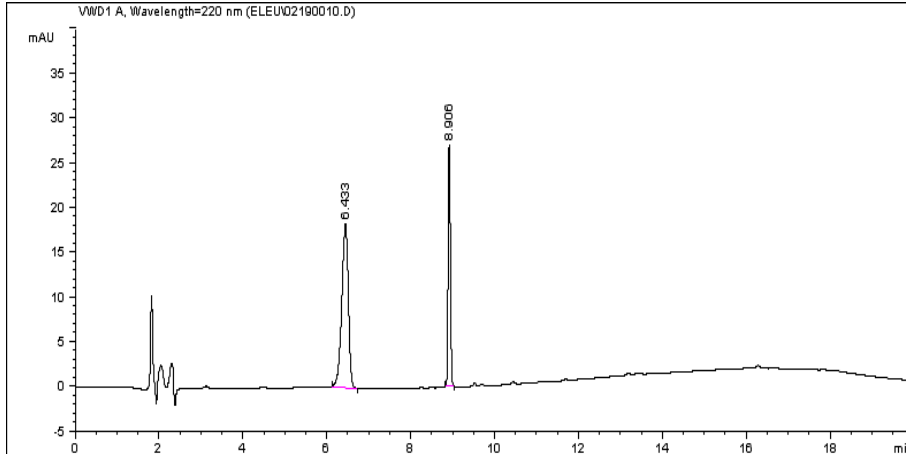


그림 246. Eleutheroside 표준혼합용액(5 ppm)의 크로마토그램

㉞ 오가피 시료 분석 결과

실제 오가피 추출물에서 나타나는 peak의 모양을 확인하기 위해 70% methanol 추출물을 분석해보았다. 그 결과 시료에서의 eleutheroside B와 E를 확인하였다[그림 247].

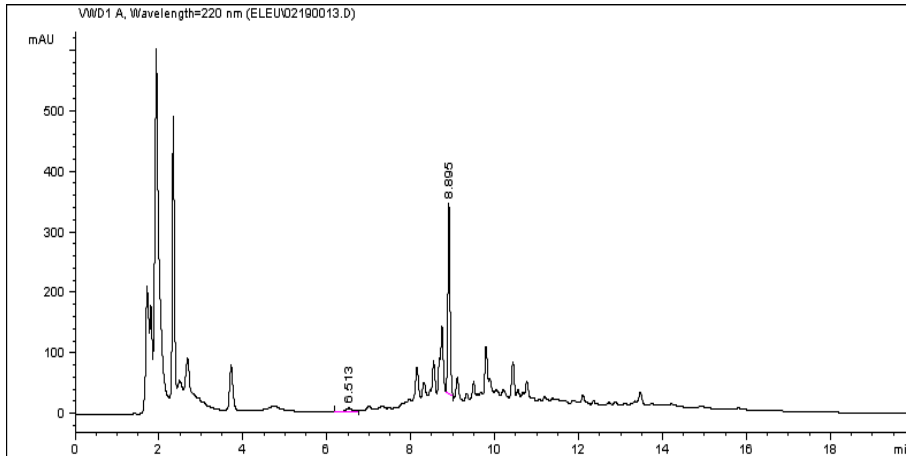


그림 247. 오가피 70% methanol 추출물의 분석 크로마토그램

③ 실험 II. 이동상 변경

Acetonitrile을 이용한 분석 조건을 확립하였으나 표준용액과 추출물의 용매가 methanol을 사용하고 있어 이동상을 methanol로 변경하여 표준용액 분석 결과를 비교해 보았다.

㉠ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : HP1100 series
- Detector : Variable wavelength detector (Wavelength; 220nm)
- Column : Kinetex C18 column (150 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Methanol
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
18	50	50
20	50	50
23	90	10
30	90	10

- Flow rate : 0.8 ml/min
- Injection volume : 5 μ l

㉡ 표준용액 및 오가피 시료 분석 결과

Eleutheroside 표준혼합용액을 분석한 결과 eleutheroside B peak 모양이 acetonitrile을 사용했을 때 보다 훨씬 sharp해진 것을 확인하였다. Eleutheroside E의 경우 큰 차이는 없었다[그림 248, 249]. 오가피 추출물의 경우 unknown peak가 더 많이 나타나 시료에서의 peak 분리를 위한 조건 확립이 필요하다.

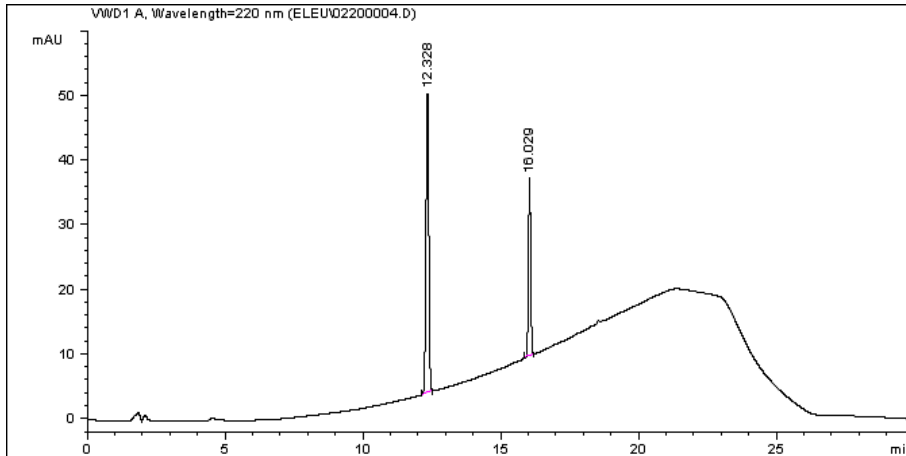


그림 248. Eleutheroside 표준혼합용액(5ppm)의 크로마토그램

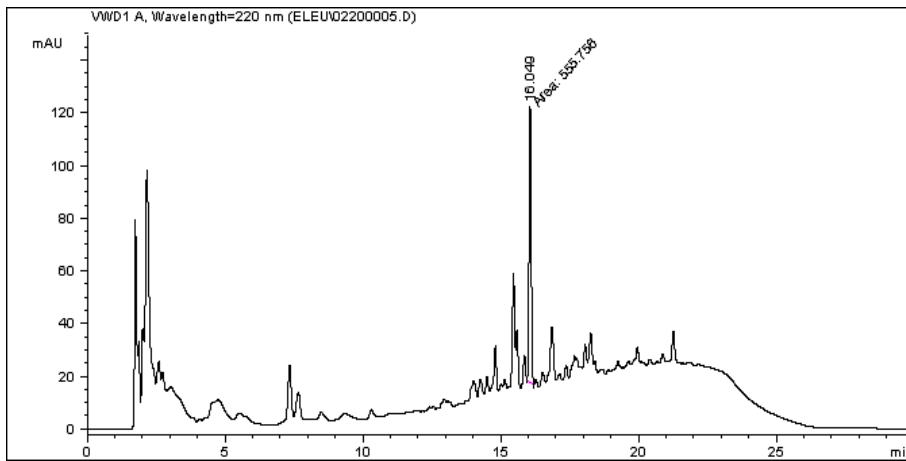


그림 249. 오가피 70% methanol 추출물의 크로마토그램

④ 실험 III. 기울기 변경

㉞ 이동상 기울기 조건

실험 II의 분석 조건에서 이동상의 기울기와 시간을 일부 변경하여 오가피 시료에서의 peak 분리조건을 확인해보았다.

- Solvent A : DW
- Solvent B : Methanol
- Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
23	50	50
25	20	80
30	20	80
32	90	10
40	90	10

㉔ 표준용액 및 오가피 시료 분석 결과

Methanol의 비율이 20분 동안 40%가 증가할 수 있도록 기울기 조건을 변경하여 분석한 결과 오가피 시료에서 eleutheroside E 주변에 겹쳐있던 unknown peak들이 분리되어 정량분석이 가능하였다[그림 250, 251].

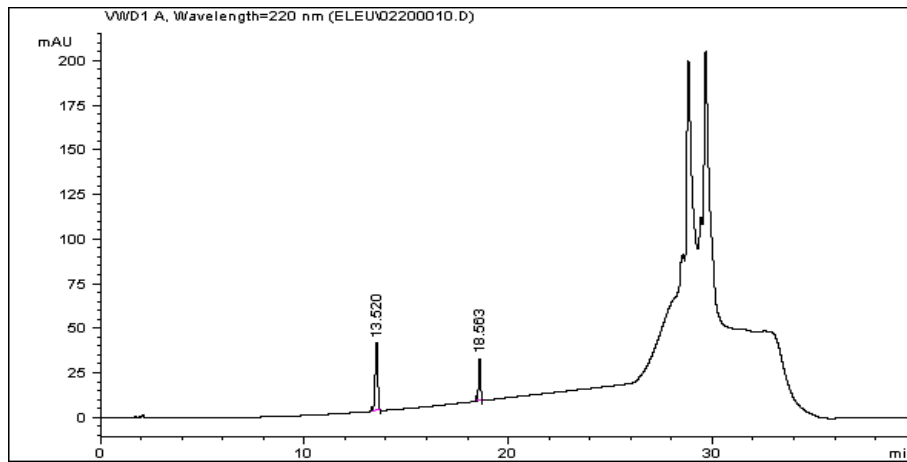


그림 250. Eleutheroside 표준혼합용액(5ppm)의 크로마토그램

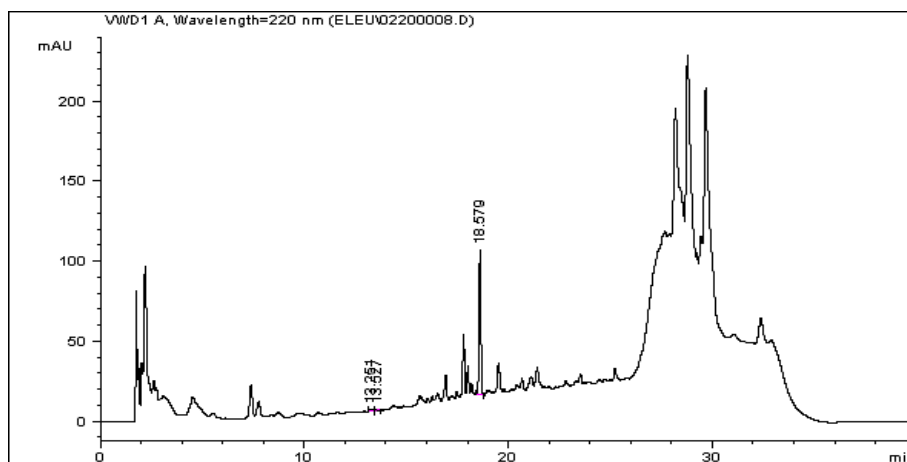


그림 251. 오가피 70% methanol 추출물의 크로마토그램

㉕ Eleutheroside 표준품의 분석 조건 확립 결과

Eleutheroside B와 E의 동시분석을 위한 분석 조건을 확인한 결과 최적 조건은 다음과 같다.

㉖ Eleutheroside B와 E의 동시분석 조건 확립

- Instrument : HP1100 series
- Detector : Variable wavelength detector (Wavelength; 220nm)
- Column : Kinetex C18 column (150 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : DW

- Solvent B : Methanol
- Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
23	50	50
25	20	80
30	20	80
32	90	10
40	90	10

- Flow rate : 0.8 ml/min
- Injection volume : 5 μ l

㉔ Eleutheroside B와 E의 동시분석 결과 크로마토그램

Eleutheroside B와 E의 혼합표준용액을 확인한 결과 eleutheroside B는 13.520분, eleutheroside E는 18.583분에 나타나는 것을 확인하였다[그림 252].

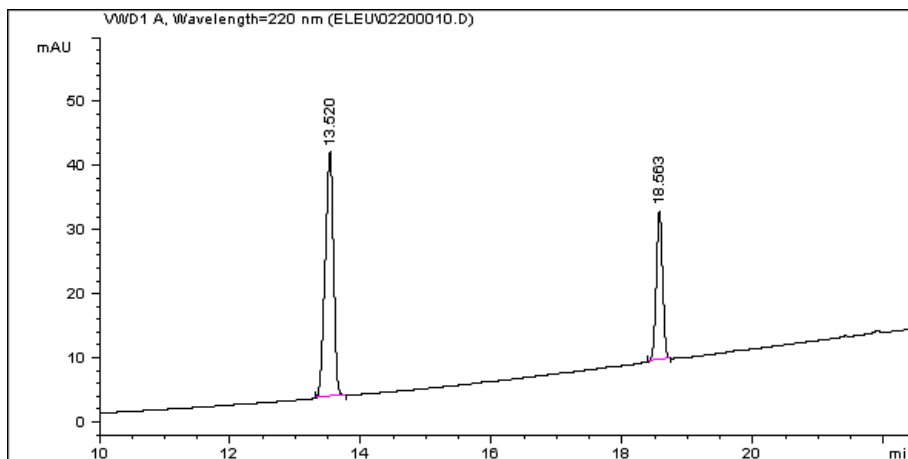


그림 252. 표준용액 (5ppm) 시료 분석 크로마토그램

(나) 시료의 추출 방법 및 분석 조건 확립

① 70% methanol 추출물과 물 추출물 비교

※ 70% methanol 추출

추출방법은 Park, H. W. (2013) 방법을 적용하였다.

분쇄한 오가피 0.5 g에 70% methanol 10 ml를 가하고 ultrasonicator에서 30분 동안 초음파 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μ m RC syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 5 μ l씩 주입하여 HPLC로 분석하였다[그림 253].

※ 물 추출

추출방법은 오가피를 구매하면서 제품에 제시된 ‘드시는 방법’을 참고하여 70% methanol 추출물과 비교해보았다.

오가피 50 g을 흐르는 물에 씻은 후 물기를 말린 후 2-3 cm 크기로 잘라 포트에 넣고 물 1L를 부어주었다. 물이 끓으면 약한 불에서 20~30분 정도 더 끓여주었다. 오가피는 체로 걸러내고 오가피 물 추출액은 상온에 1시간 정도 식혀주었다. 추출물을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액은 0.2 µm RC syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 5 µl씩 주입하여 HPLC로 분석하였다[그림 254].

㉔ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : HP1100 series
- Detector : Variable wavelength detector (Wavelength; 220nm)
- Column : Kinetex C18 column (150 × 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Methanol
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
23	50	50
25	20	80
30	20	80
32	90	10
40	90	10

- Flow rate : 0.8 ml/min
- Injection volume : 5 µl

㉕ 오가피 시료 분석 결과 크로마토그램

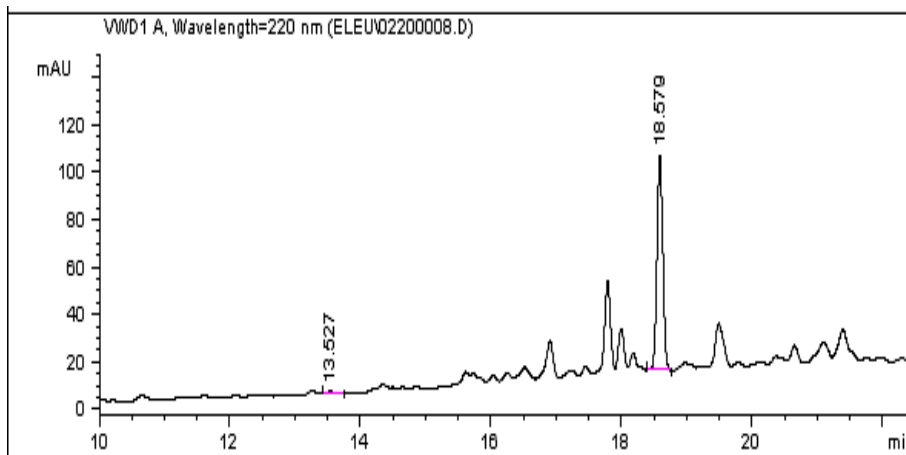


그림 253. 오가피 70% methanol 추출물 분석 크로마토그램

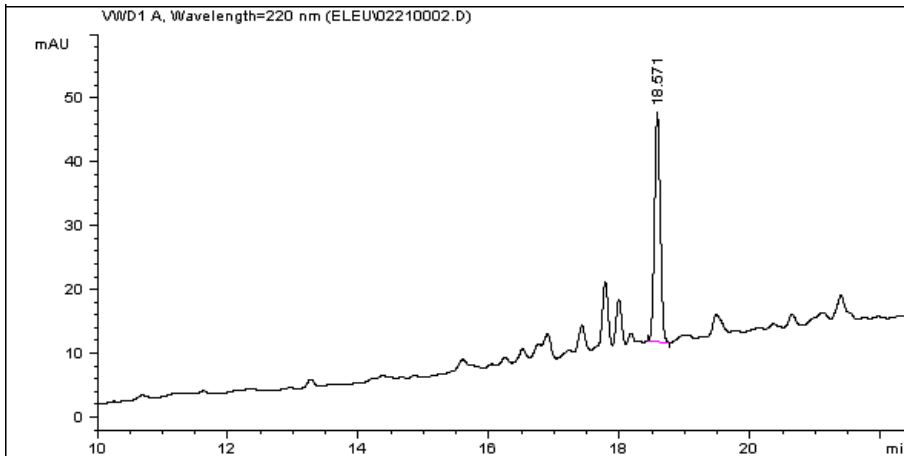


그림 254. 오가피 물 추출물 분석 크로마토그램

② VWD를 이용한 timetable 설정

DAD를 이용할 경우 파장 2개를 동시에 분석이 가능하지만 eleutheroside B와 E를 따로 정량해야 하는 단점이 있다. VWD에서 timetable을 설정하여 시간대별로 파장을 달리하여 scan 할 수 있는 기능이 있다. Eleutheroside B는 220 nm에서, eleutheroside E는 210 nm 파장에서 분석될 수 있도록 timetable 조건을 설정하여 예비실험을 진행하였다.

㉞ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : HP1100 series
- Detector : Variable wavelength detector
- Column : Kinetex C18 column (150 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Methanol
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
23	50	50
25	20	80
30	20	80
32	90	10
40	90	10

- Flow rate : 0.8 ml/min
- Injection volume : 5 μ l

㉔ Timetable 조건 확인 실험 (실험 I)

시간대별로 파장을 달리하여 blank와 sample을 구분하여 scan할 수 있다. Sample에서 unknown peak signal이 나타나지 않는 400 nm를 blank로 설정하고, 표준용액 peak가 나타나는 시간대에 각각 220 nm와 210 nm로 분석될 수 있도록 sample을 설정하였다 [그림 255-256].

Line	Time	Wavelength	Balance	Scan
1	0.0	400	x	Blank
2	13.0	220	x	Sample
3	14.0	400	x	Blank
4	18.1	210	x	Sample
5	19.0	400	x	Blank

- VWD signal wavelength: 400nm
- Peak width (Responsetime): > 0.1min (2 s)

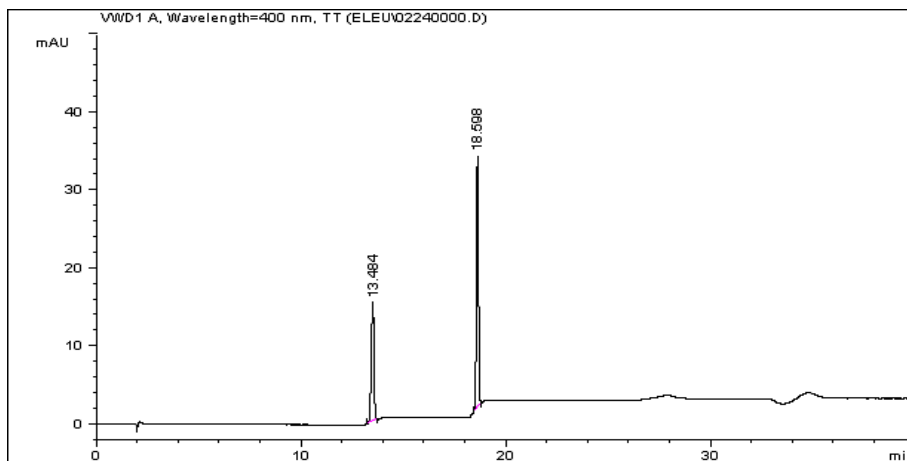


그림 255. 표준용액 (5ppm) 분석 결과 크로마토그램

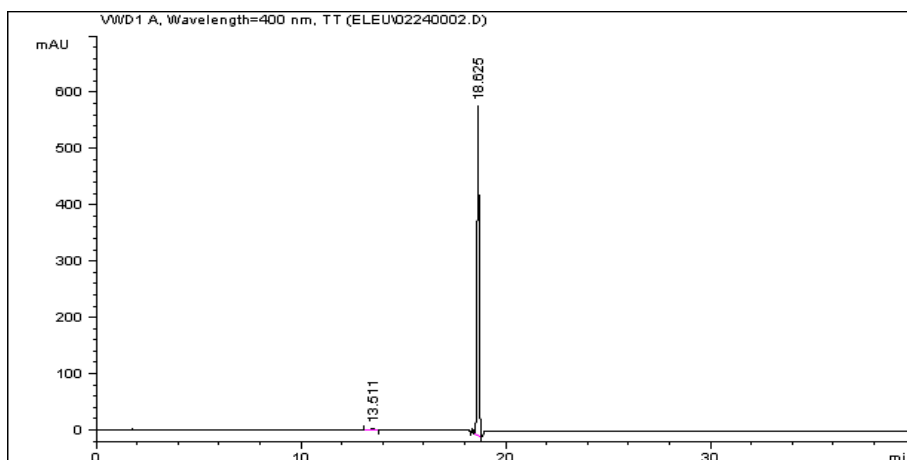


그림 256. 70% methanol 추출물 분석 결과 크로마토그램

㉔ Timetable 조건 확인 실험 (실험 II)

Line	Time	Wavelength	Balance	Scan
1	0.0	400	x	Blank
2	12.5	220	o	Sample
3	14.5	400	x	Blank
4	17.5	210	o	Sample
5	19.5	400	x	Blank

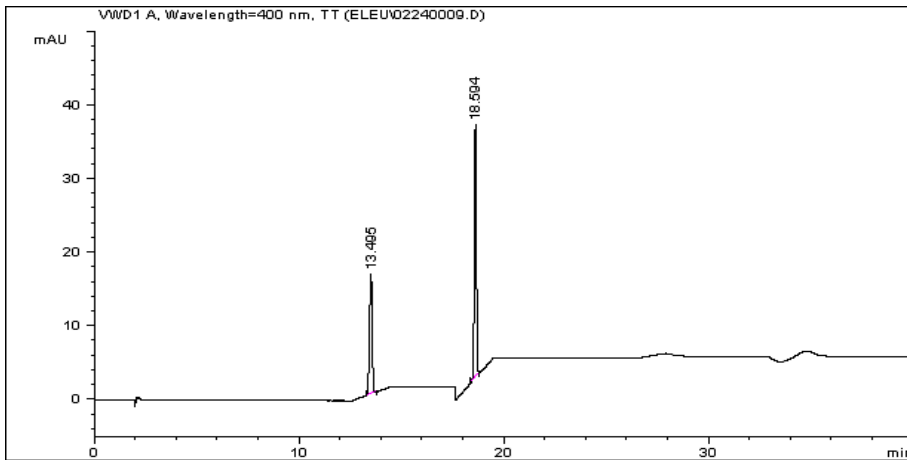


그림 257. 표준용액 (5ppm) 분석 결과 크로마토그램

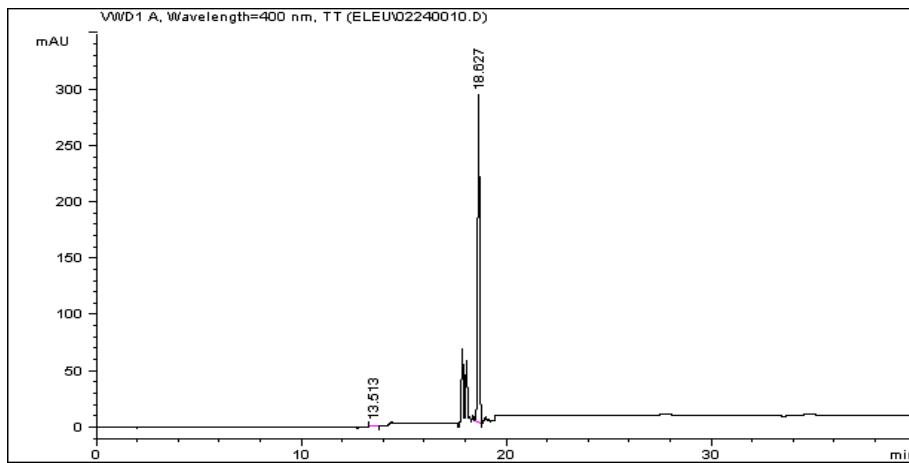


그림 258. 70% methanol 추출물(1/2회석) 분석 결과 크로마토그램

㉕ Timetable 조건 확인 실험 (실험 III)

Line	Time	Wavelength	Balance	Scan
1	0.0	400	x	Blank
2	13.0	220	o	Sample
3	14.0	400	x	Blank
4	18.0	210	o	Sample
5	19.5	400	x	Blank

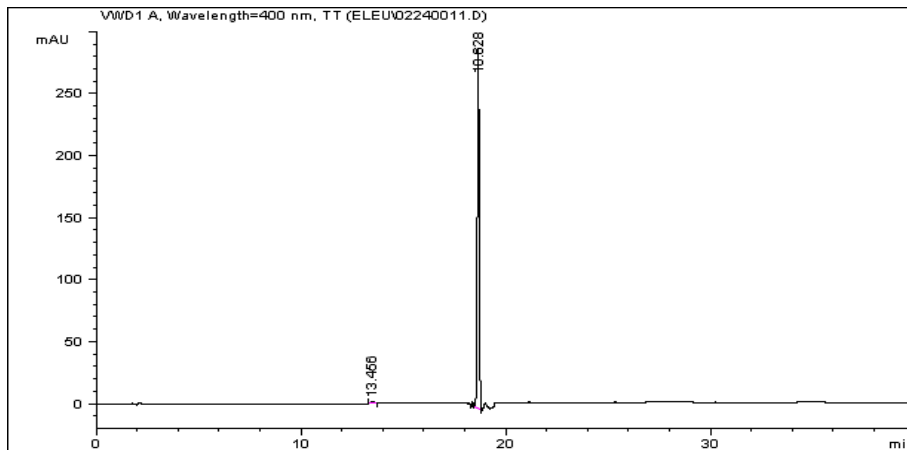


그림 259. 70% methanol 추출물(1/2희석) 분석 결과 크로마토그램

㉞ Timetable 조건 확인 실험 (실험 IV)

Line	Time	Wavelength	Balance	Scan
1	0.0	220	x	Blank
2	10.0	220	x	Sample
3	15.0	210	x	Sample
4	20.0	210	x	Blank

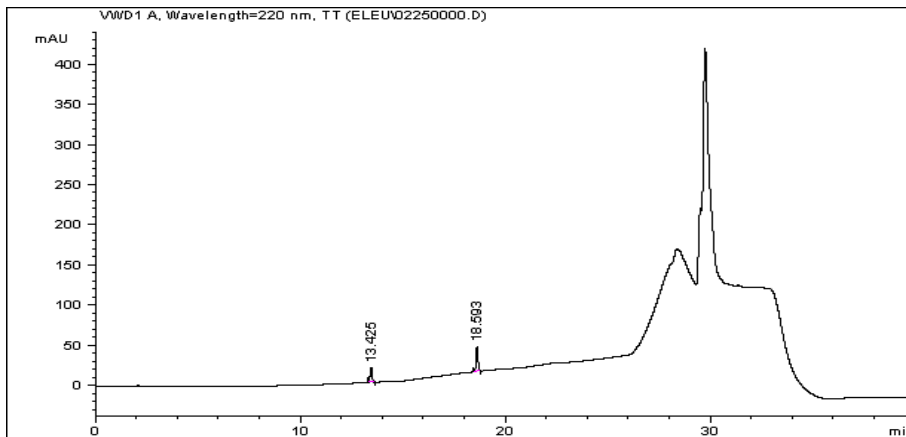


그림 260. 표준용액 (5ppm) 분석 결과 크로마토그램

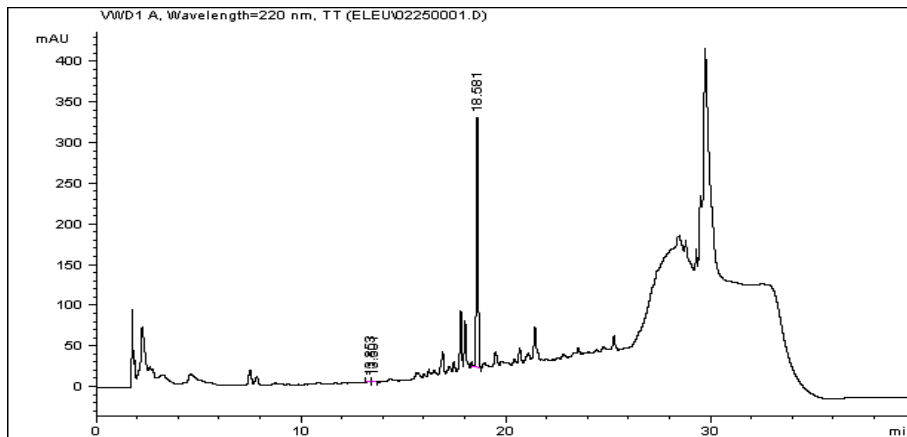


그림 261. 70% methanol 추출물(1/2희석) 분석 결과 크로마토그램

㉞ Timetable 조건 확인 실험 결과

Eleutheroside B와 E를 동시에 분석하면서 sample에서 표준용액 시간대 이외의 unknown peak는 나타나지 않도록 파장을 설정하였다. 그 결과 표준용액과 시료에서 eleutheroside B와 E만이 검출되긴 하였지만 sample E의 경우 peak area를 integration 하기엔 peak 모양이 적합하지 않았다. 그래서 210 nm와 220 nm에서만 분석할 수 있는 IV 방법을 최종 분석 조건으로 확립하였다.

(다) Eleutheroside 분석법 검증

① 정량한계, 검출한계

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 분석기기의 감도를 검증할 수 있는데, 다양한 농도의 표준용액을 분석하여 S/N(signal과 noise 비율)을 구한결과는 다음과 같다[표 73]. 검출한계는 S/N>3~5배, 정량한계는 S/N>10배(LOD의 3~5배 이상)로 하였다.

표 73 Eleutheroside 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

	Eleutheroside B	Eleutheroside E
LOD (ng)	0.5	0.5
LOQ (ng)	2.5	2.5

② 직선성

㉠ 표준용액 조제

Eleutheroside B 표준품 5 mg을 100% methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Eleutheroside E 표준품은 5 mg에 60% methanol 5ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 각 stock solution을 동량으로 혼합하여 100 ppm working solution mixture를 만들고 70% methanol로 단계별로 희석하여 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 5 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 262].

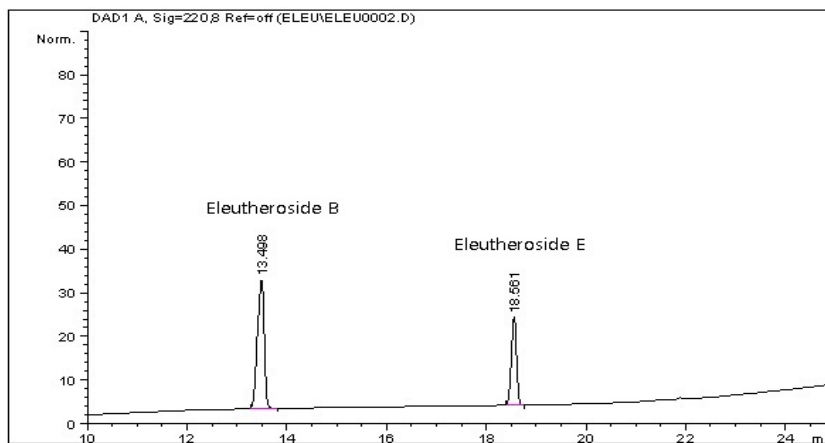


그림 262. Eleutheroside 표준혼합용액 (5 ppm) 분석 크로마토그램

㉔ Eleutheroside 표준용액(0.1~100 ppm) 검량선의 직선성 시험

Eleutheroside 표준용액(0.1~100 ppm)을 분석하여 얻은 검량선은 $R^2=0.9999$ 이상으로서 직선성이 우수함을 확인하였다[그림 263].

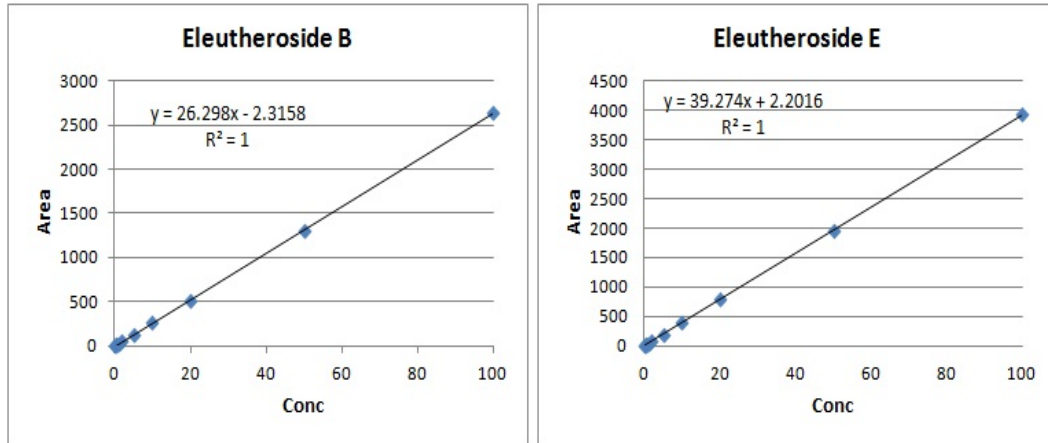


그림 263. Eleutheroside B와 E의 검량선

② 표준품 UV spectra

㉔ 최대흡광파장 확인

광다이오드 검출기를 사용(파장범위; 190~400 nm)하여 Eleutheroside 2종의 최대 흡광 파장을 확인하였다. 그 결과 eleutheroside B와 E의 최대 흡광파장은 192 nm이었다. 문헌에서 많이 사용된 파장과 비교해보면 Feng S. L et al. (2006)에서는 eleutheroside B 파장이 206 nm, E가 220 nm이었고, Ma, Y. C. et al. (2011)에서는 B가 205 nm, E가 220 nm이었다. 그러나 두 문헌에서는 이동상으로 acetonitrile을 사용하였다. 본 연구에서는 methanol의 cutoff 값이 205 nm이므로 eleutheroside B는 210 nm에서, E는 220 nm에서 peak 감도를 다시 비교해보기로 하였다[그림 264].

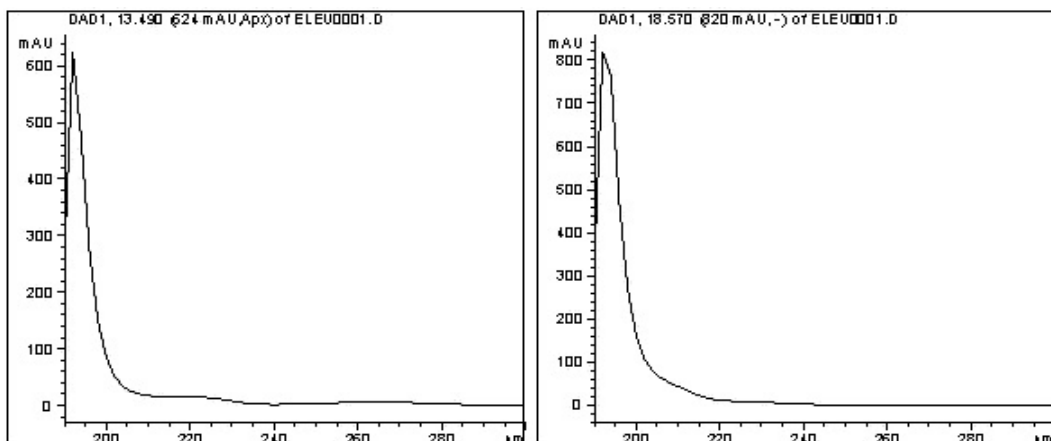


그림 264. Eleutheroside B와 E UV spectrum

㉔ 포장 비교.

DAD(Diode array detector)를 이용하여 210, 220 nm에서 eleutheroside B와 E의 감도를 비교해보았다. 그 결과 eleutheroside B는 220 nm에서, E는 210 nm에서 peak 감도가 더 좋은 것을 확인하였다[그림 265-267].

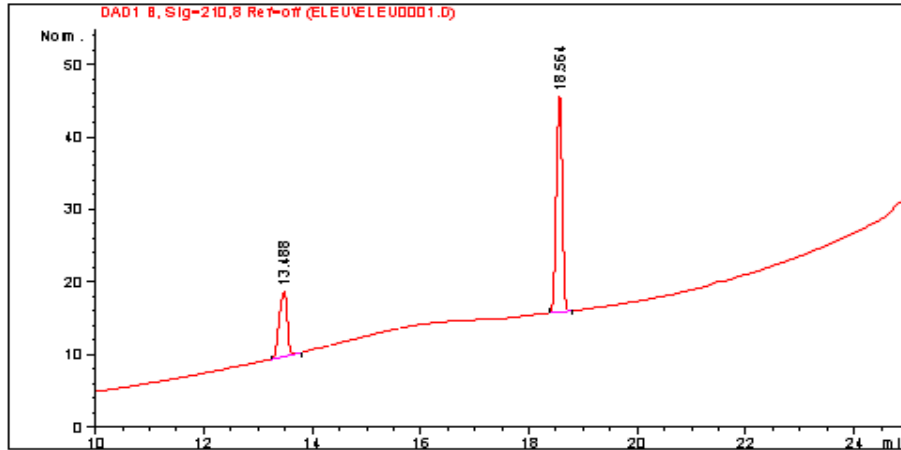


그림 265. 210 nm에서 eleutheroside 표준용액(5ppm) 분석 결과 크로마토그램

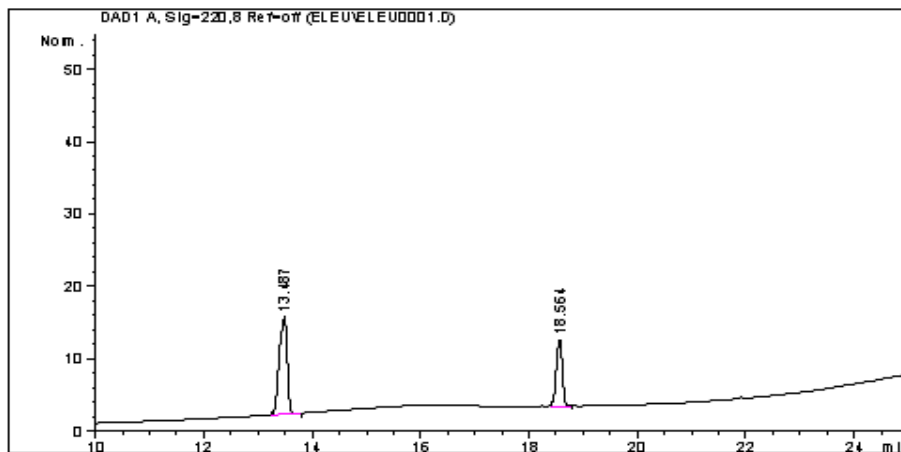


그림 266. 220 nm에서 eleutheroside 표준용액(5ppm) 분석 결과 크로마토그램

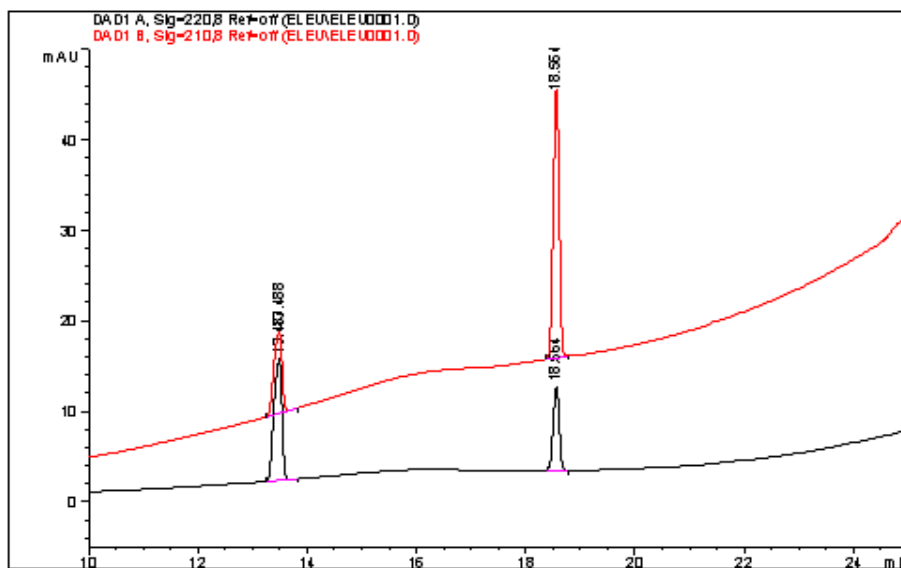


그림 267. 210 nm와 220 nm 비교 분석 결과 크로마토그램

③ 최종 분석조건을 이용한 시료분석

70% methanol로 추출한 오가피와 인삼 시료 분석 결과는 다음과 같다[그림 268-270].

㉞ 분석기기 및 분석조건

- Instrument : HP1100 series
- Detector : Variable wavelength detector
- Column : Kinetex C18 column (150 X 4.6 mm, 5 micron)
- Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Methanol
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
23	50	50
25	20	80
30	20	80
32	90	10
40	90	10

- Flow rate : 0.8 ml/min
- Injection volume : 5 μ l
- VWD timetable

Line	Time	Wavelength	Balance	Scan
1	0.0	220	x	Blank
2	10.0	220	x	Sample
3	15.0	210	x	Sample
4	20.0	210	x	Blank

㉞ 시료 분석 결과 크로마토그램

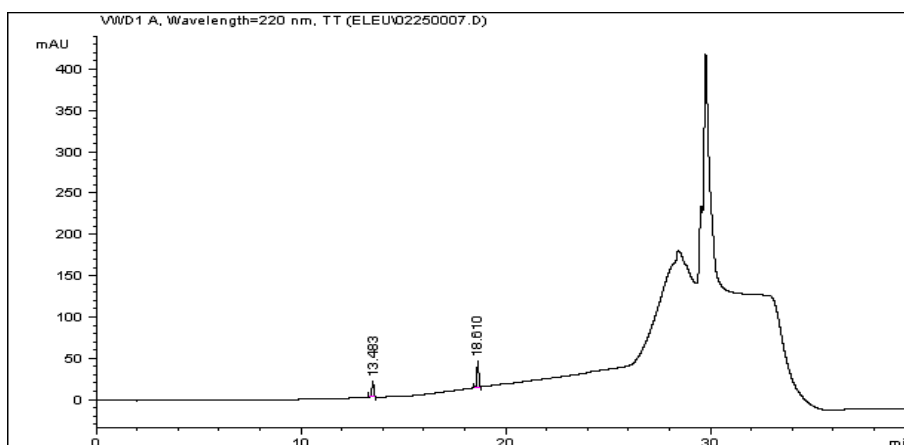


그림 268. Eleutheroside 표준혼합용액 (5 ppm) 분석 크로마토그램

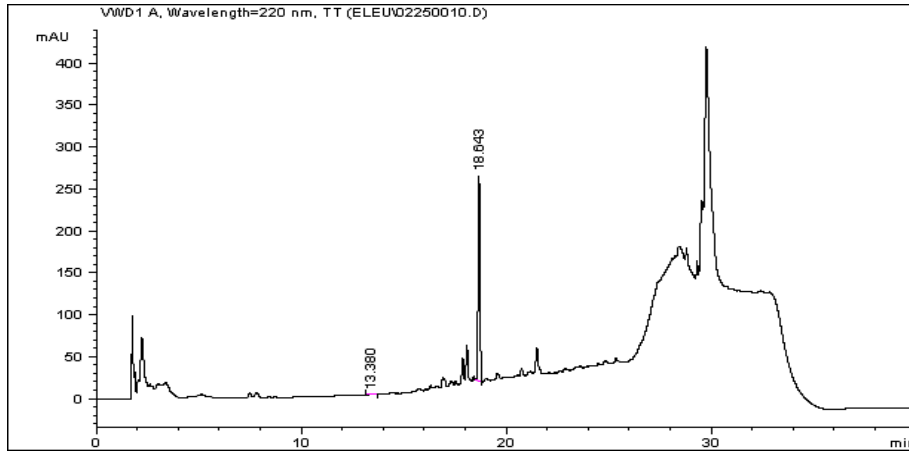


그림 269. 오가피 70% methanol 추출물 분석 결과 크로마토그램

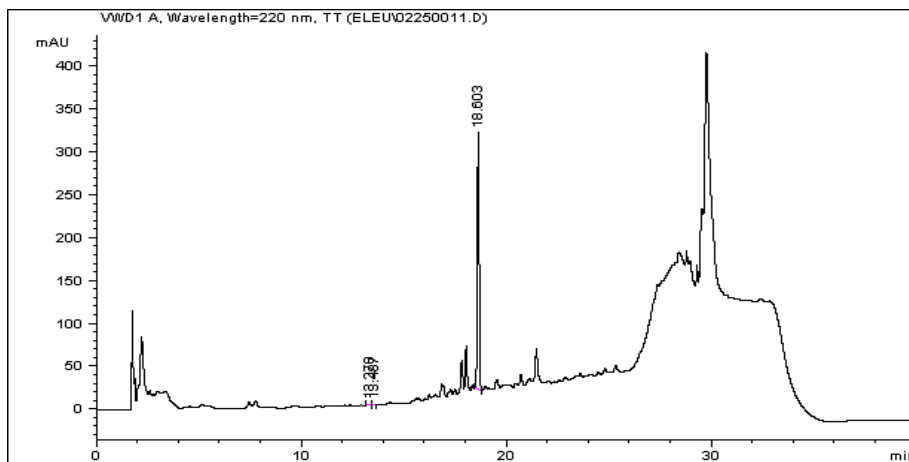


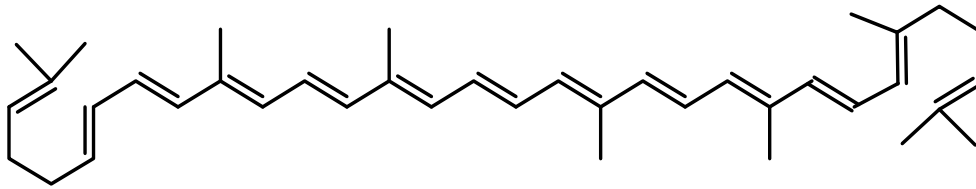
그림 270. 인삼 70% methanol 추출물 분석 결과 크로마토그램

2. 민간육종가의 요구에 의한 기능성 생화학 성분 분석 기술 추가 개발

가. 수박, 멜론 등에서 lycopene, β -carotene 성분 동시분석법 확립

(1) 수박에서 lycopene 성분 정밀분석법 확립

(가) Lycopene 구조식



Lycopene (C₄₀H₅₆)

(나) 이화학적 성상

- ① 분자량 : 536.87
- ② 성상 : 적자색의 장침상 결정
- ③ 용점 : 172 - 173 °C
- ④ 용해도 : Water - Not available, Methanol, Alcohol - Insoluble
Chloroform, Benzene - Soluble

(다) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : HP 1100 series HPLC (Hewlett Packard, USA)
- ② Detector : HP 1100 series Multiwavelength Detector (476nm)
- ③ Column : Shiseido (250 X 4.60mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Methanol
 - Solvent B : Methyl-Tert-Butyl-Ether (MTBE)
- ⑤ Flow rate : 1.2 ml/min
- ⑥ Injection volume : 10 μ l

(라) 검량선 작성

Lycopene 표준품 10 mg을 chloroform 10 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 chloroform 10 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 50, 25, 10, 5, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 10 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 1, 2].

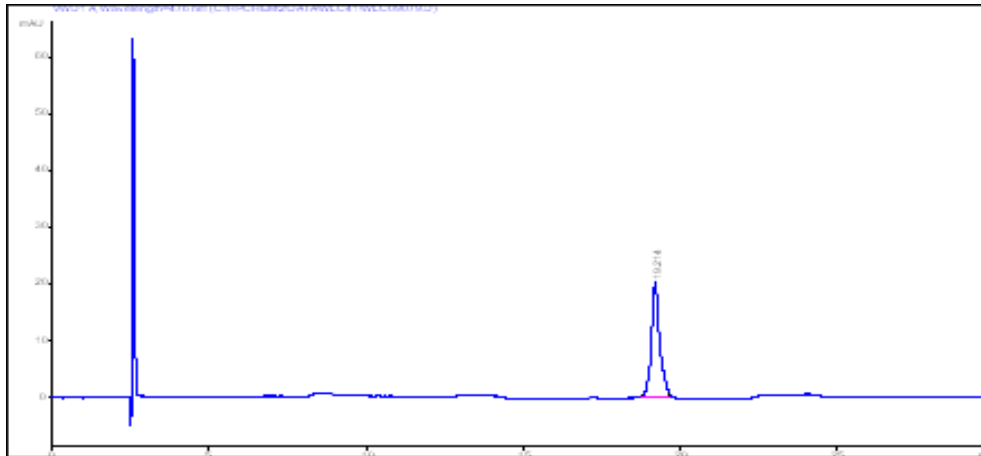


그림 1. Lycopene 표준용액(10 ppm) 분석 결과 크로마토그램

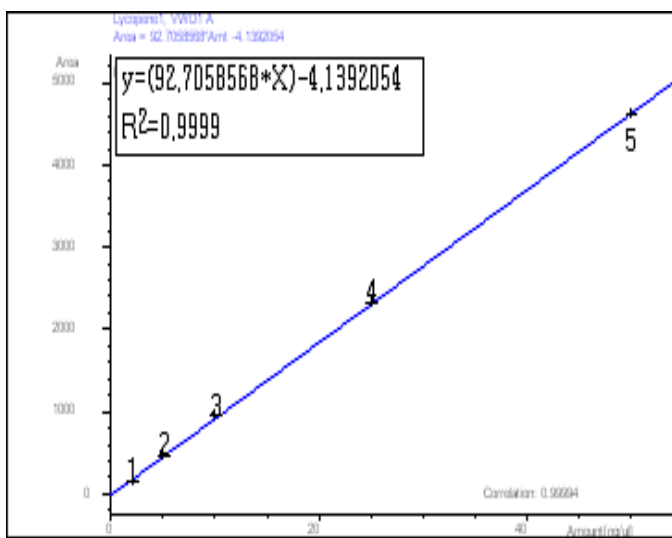


그림 2. Lycopene 검량선

(마) 시료의 추출 및 정제

수박 세절시료 2 g에 0.05 g magnesium carbonate와 acetone : hexane (4:6) 100 ml 을 가하고 high-speed homogenizer에서 고속으로 5분간 마쇄 추출하였다. 추출물을 Whatman No.1 filter paper에 여과한 후 500 ml 용량의 분액여두에 옮겼다. 10% sodium chloride 50 ml로 2회 분배하여 수용액층을 버리고, 다시 water 50 ml로 2회 분 배하여 수용액층을 버렸다. 유기용매층을 20 g의 anhydrous sodium sulfate층에 통과시 켜 탈수시킨 후 40 °C에서 감압 농축, 건조하였다. 잔류물을 2 ml chloroform에 재용해 하여 HPLC-UV 공시액으로 하였다[그림 3].

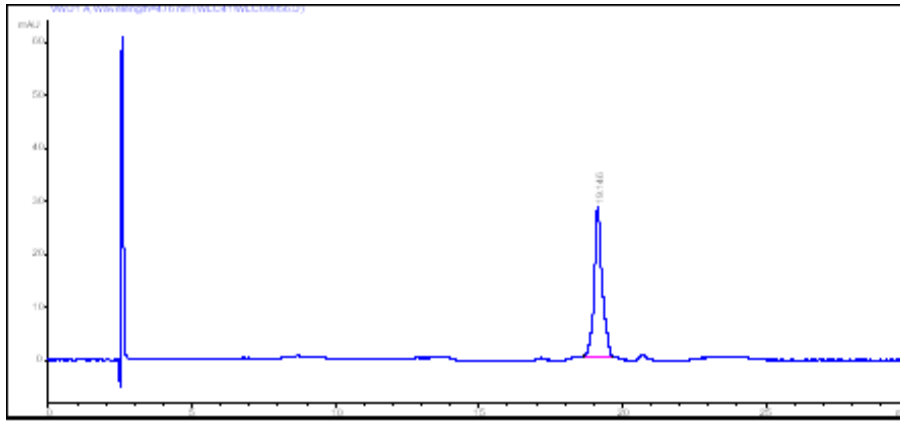
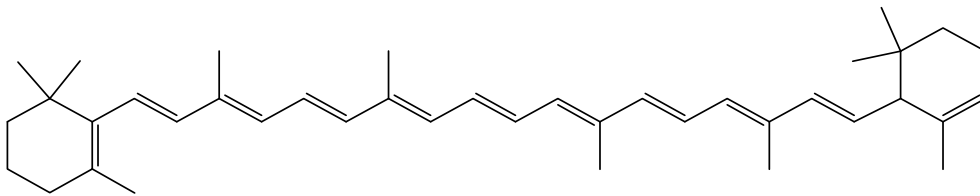


그림 3. 수박 시료 분석 결과 크로마토그램

(2) 호박, 멜론의 β -Carotene 성분 정밀분석법 확립

(가) β -Carotene 구조식



β -Carotene ($C_{40}H_{56}$)

(나) 이화학적 성상

- ① 분자량 : 536.87
- ② 성상 : 적자색 결정
- ③ 융점 : 180 - 182 °C
- ④ 밀도 : $0.941 \pm 0.06 \text{ g/cm}^3$
- ⑤ 용해도 : Water - Insoluble

Diethyl ether, acetone, benzene, chloroform, benzene - Soluble

(다) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : HP 1100 series HPLC (Hewlett Packard, USA)
- ② Detector : HP 1100 series Multiwavelength Detector (450nm)
- ③ Column : Shiseido C18 column (250 X 4.60mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Methanol
 - Solvent B : Methyl-Tert-Butyl-Ether (MTBE)
- ⑤ Flow rate : 1.2 ml/min
- ⑥ Injection volume : 10 μl

(라) 검량선 작성

β -Carotene 표준품 10 mg을 chloroform 10 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution 을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 chloroform 10 ml로 정용 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 20, 10, 5, 2 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 10 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 4, 5].

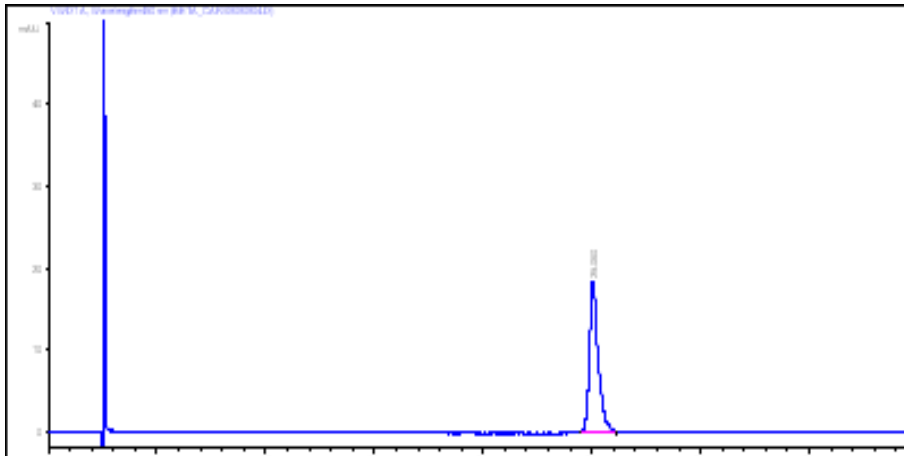


그림 4 β -Carotene 표준용액(10ppm) 분석 결과 크로마토그램

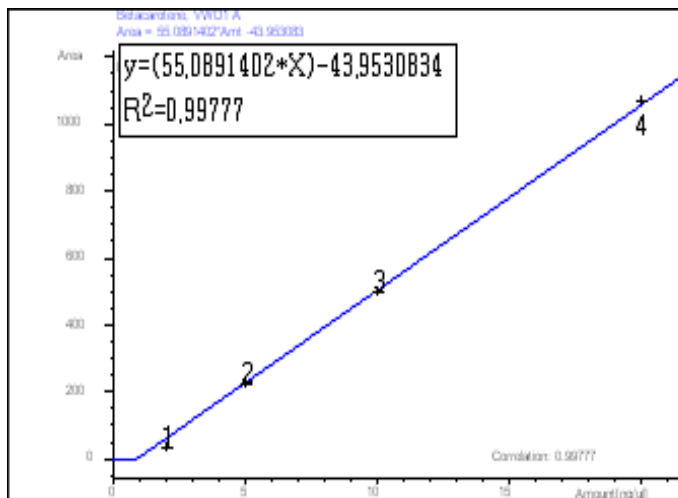


그림 5. β -Carotene 검량선

(마) 시료의 추출

호박과 멜론 각각의 시료 2 g에 0.05 g magnesium carbonate와 acetone : hexane (4:6) 100 ml을 가하고 high-speed homogenizer에서 고속으로 5분간 마쇄 추출하였다. 추출물을 Whatman No.1 filter paper에 여과한 후 500 ml 용량의 분액여두에 옮겼다. 10% sodium chloride 50 ml로 2회 분배하여 수용액층을 버리고, 다시 water 50 ml로 2회 분배하여 수용액층을 버렸다. 유기용매층을 20 g의 anhydrous sodium sulfate층에 통과시켜 탈수시킨 후 40 $^{\circ}$ C에서 감압 농축, 건조하였다. 잔류물을 2 ml chloroform에 재용해하여 HPLC-UV 공시액으로 하였다[그림 6, 7].

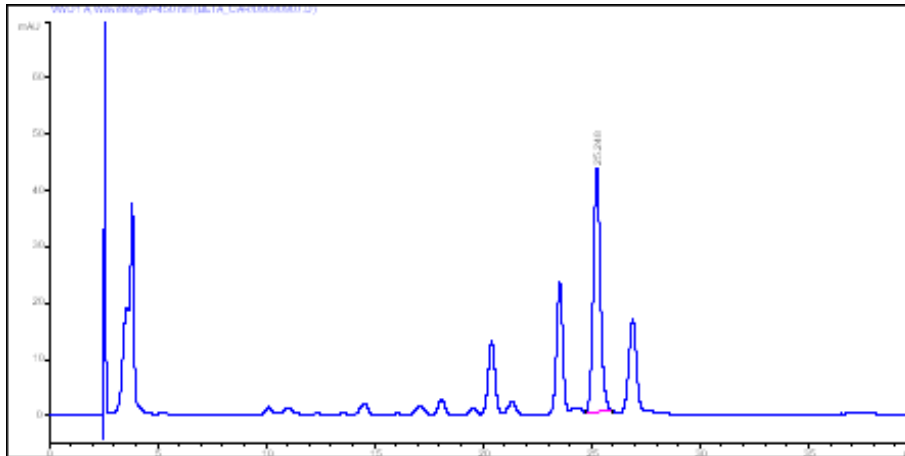


그림 6. 호박 시료 분석 결과 크로마토그램

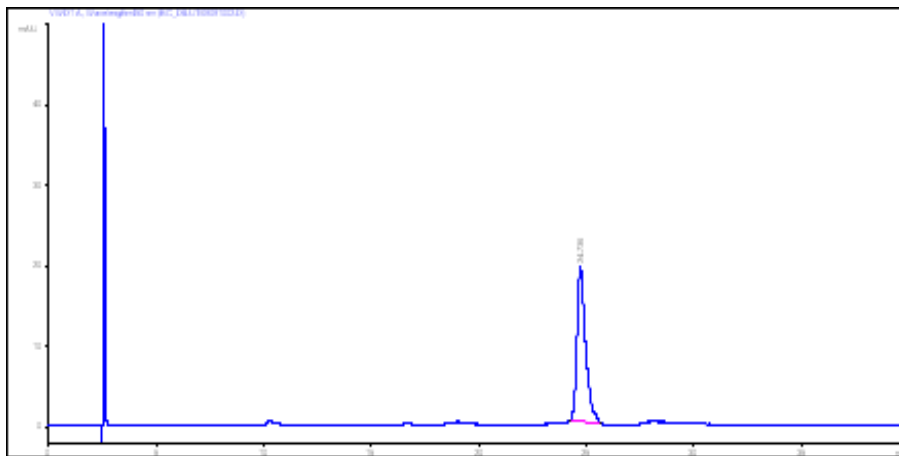


그림 7. 멜론 시료 분석 결과 크로마토그램

(3) Carotenoids (lycopene 및 β -carotene) 성분 동시 분석법 확립

Lycopene과 β -carotene 분석을 위한 추출 및 기기분석 조건을 확립하였다. 그러나 추출 과정을 좀 더 간소화 하여 추출 시간을 줄이기 위해 추출용매 조성과 기기분석 조건을 확립하기 위한 예비실험들을 진행하였다(Data not shown). 그 결과 lycopene과 β -carotene 을 동시에 추출하면서 효율을 높이고, 추출시간을 단축하는 최적 조건을 확립하였다.

(가) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Shimadzu-10A HPLC (KYOTO, Japan)
- ② Detector : Shimadzu SPD-10Avp (Wavelength : 476nm)
- ③ Column : Shiseido C18 (UG120, 250 X 4.60mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 1. Solvent A : Methyl-t-butyl-ether
 2. Solvent B : Methanol
- ⑤ Flow rate : 1.2 ml/min
- ⑥ Injection volume : 10 μ l

⑦ Gradient program

Time(min)	%A(MEOH)	%B(MTBE)
0	100	0
7	100	0
14	82	18
18	82	18
20	100	0
30	100	0

(나) 검량선 작성

Lycopene과 β -carotene 표준품은 wako(Japan)에서 구입하여 사용하였다. Lycopene과 β -carotene 각각 1000 ppm 농도의 stock solution을 동량으로 혼합하여 mixture를 만들고 MTBE 용액으로 단계적으로 희석하여 100, 50, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 10 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 8-10].

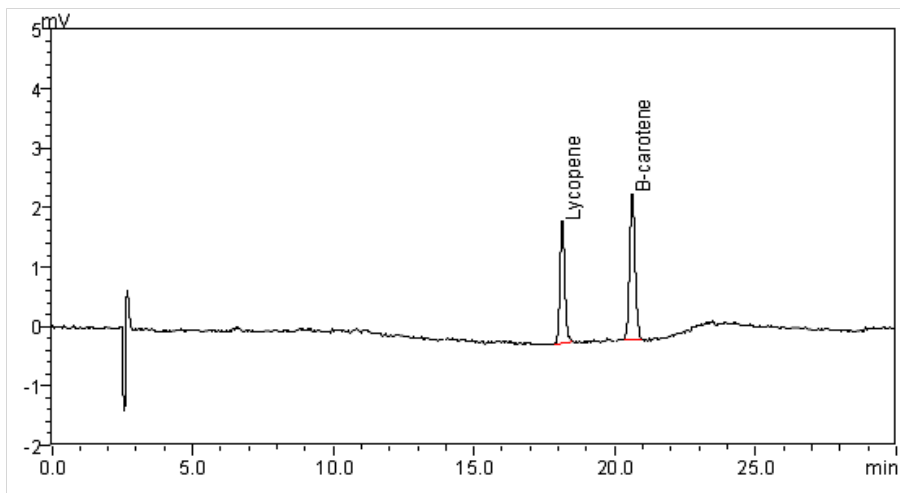


그림 8. Lycopene과 β -carotene 표준용액 분석 결과 크로마토그램

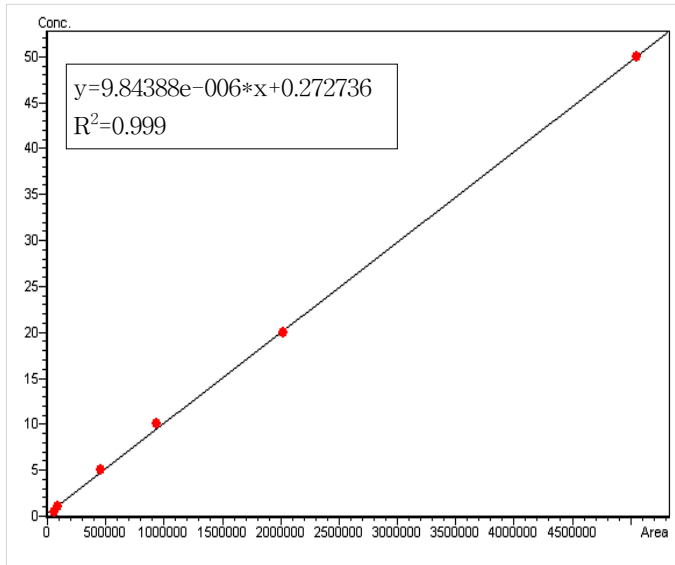


그림 9. Lycopene 검량선

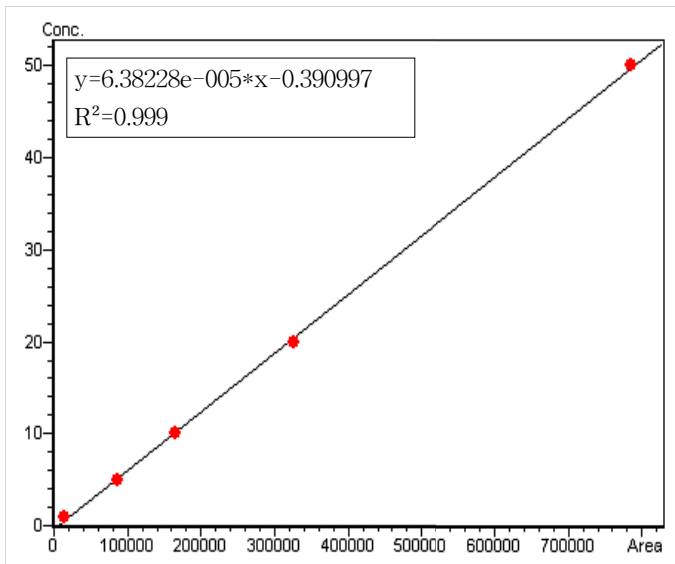


그림 10. β -carotene 검량선

(다) 시료의 추출

시료 2g에 hexane : acetone : ethanol (2:1:1, v/v/v) 20 ml을 넣고 vortex mixer로 10 초간 혼합 하였다. Tube를 shaker에 고정 후 250 rpm에서 10분간 추출하였다. 추출물에 10 ml의 물을 가하고 다시 5분 동안 혼합해주었다. 시료를 원심분리기로 4 °C 상태에서 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 하였다. 유기용매 층(상위 층)을 100 ml 용량의 플라 스크에 옮기고 40 °C에서 감압 농축 하였다. 추출물에 MTBE 용액 10 ml로 용해시키고 0.2 μ m PTFE syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다. 각 시료 는 3반복 추출하여 분석하였다[그림 11-13].

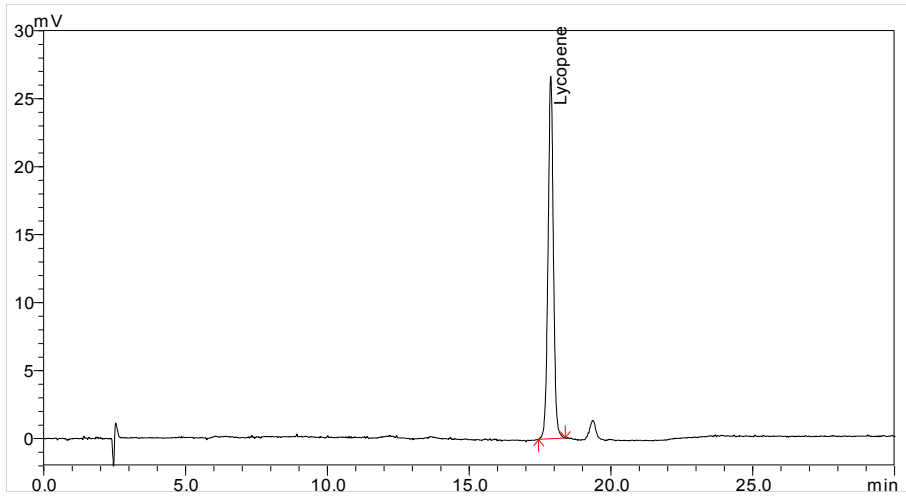


그림 11. 수박 시료 분석 결과 크로마토그램

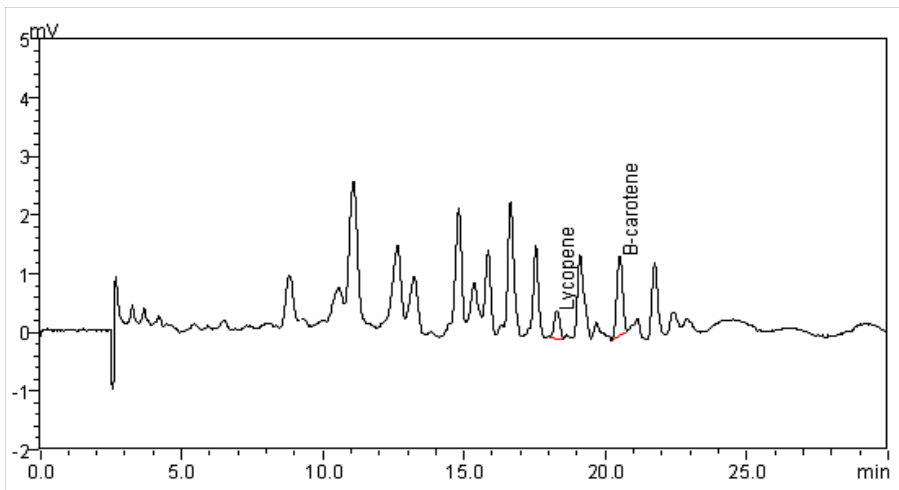


그림 12. 감귤 시료 분석 결과 크로마토그램

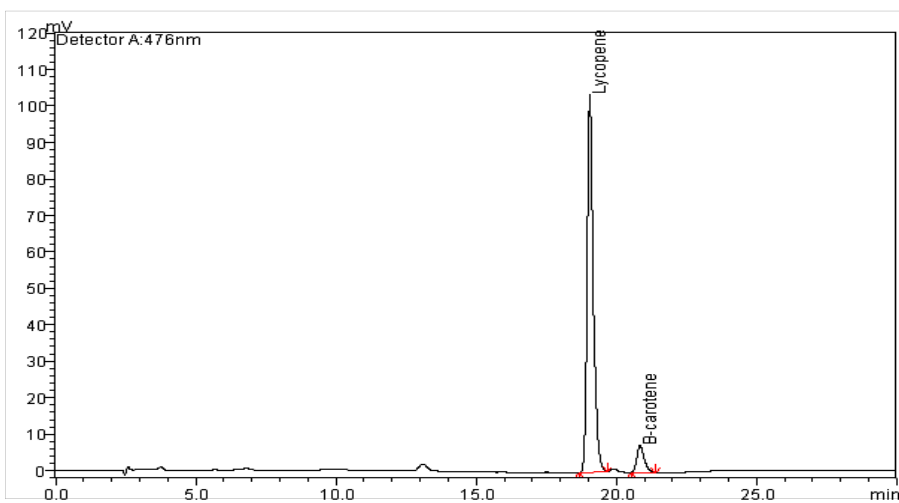
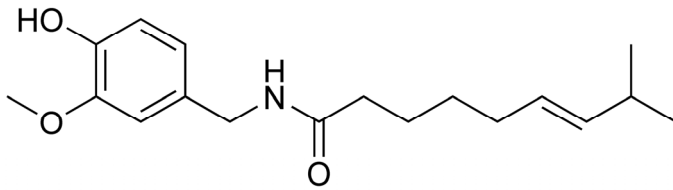


그림 13. 토마토 시료 분석 결과 크로마토그램

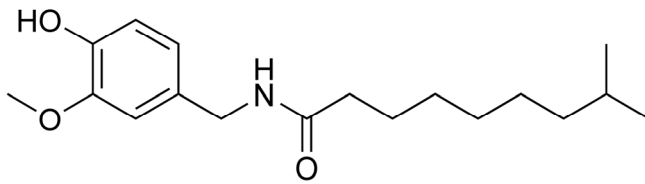
나. 고추의 신미성분(Capsaicinoid) 정밀분석법 확립

(1) 고추의 신미성분(Capsaicin & dihydrocapsaicin) 분석기술 확립

(가) Capsaicin & dihydrocapsaicin 구조식



Capsaicin (C₁₈H₂₇NO₃)



Dihydrocapsaicin (C₁₈H₂₉NO₃)

(나) 이화학적 성상

■ Capsaicin

- ① 분자량 : 305.41
- ② 성상 : 무색의 단사결정계 판사결정
- ③ 융점 : 62-65°C
- ④ 비등점 : 0.01 mmHg에서 210-220°C
- ⑤ 용해도 : Water - Insoluble, Ethanol, Chloroform, Benzene - Soluble

■ Dihydrocapsaicin

- ① 분자량 : 307.43
- ② 성상 : 흰색 결정
- ③ 용해도 : Water - Sparingly soluble

(다) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : HP 1100 series HPLC (Hewlett Packard, USA)
- ② Detector : HP 1100 series Diode Array Detector (UV 280nm)
- ③ Column : Shiseido C18 (250 X 4.60mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Methanol (0.1% formic acid)
 - Solvent B : Water (0.1% formic acid)
- ⑤ Flow rate : 1.0 ml/min
- ⑥ Injection volume : 20 μ l

(라) 검량선 작성

Capsaicin 및 Dihydrocapsaicin 표준품 10 mg을 각각 methanol 10 mL에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 각각 2 mL씩 혼합하여 500 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 혼합 용액을 단계적으로 희석하여 25, 10, 5, 2, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 14-16].

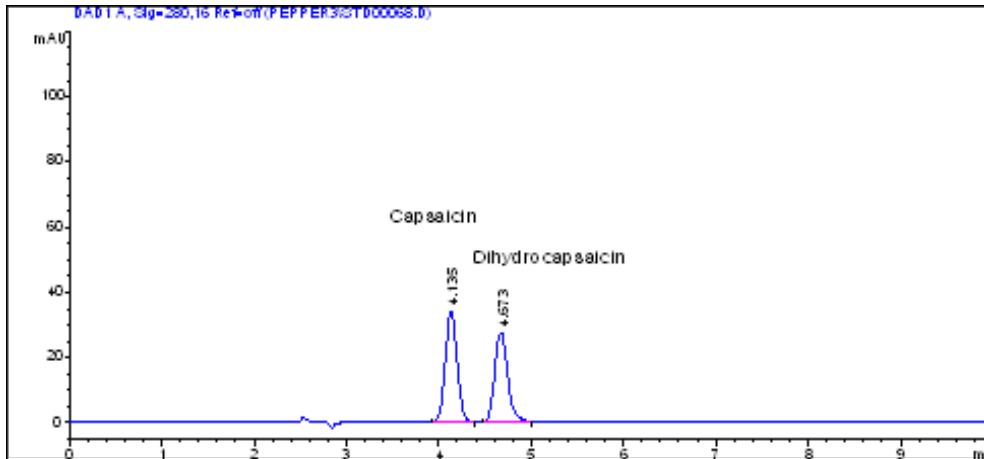


그림 14. Capsaicin & Dihydrocapsaicin 표준용액(25ppm)의 크로마토그램

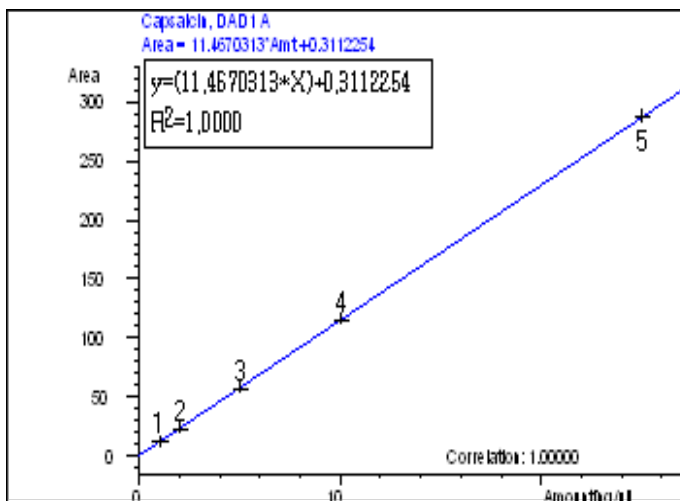


그림 15. Capsaicin 검량선

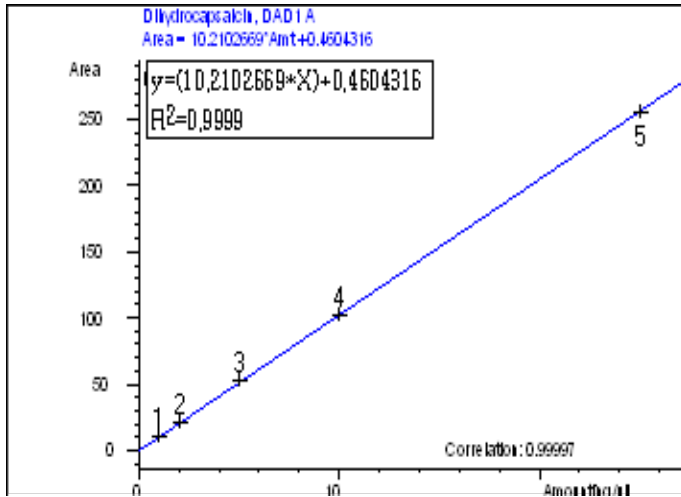


그림 16. Dihydrocapsaicin 검량선

(마) 시료의 추출

고춧가루 50 mg을 칭량하여 methanol 1 mL을 넣고 실온에서 약 50분 정도 진탕하였다. 시료 추출물을 8,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였고, 상층액을 0.2 µm syringe filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다[그림 17].

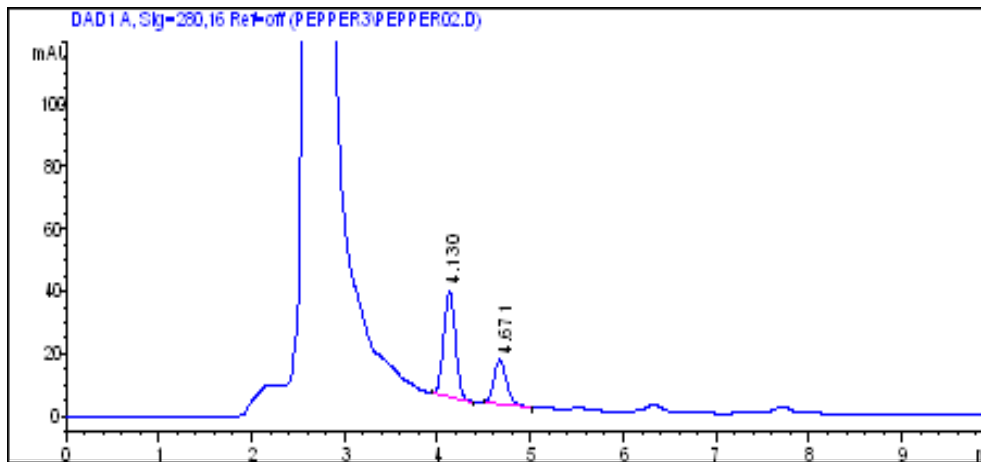
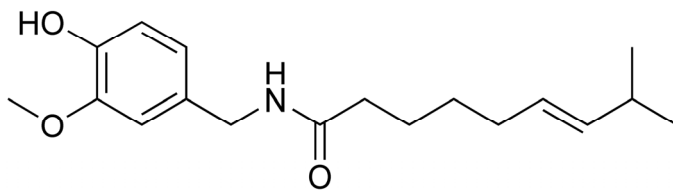


그림 17. 고춧가루 시료 분석 결과 크로마토그램

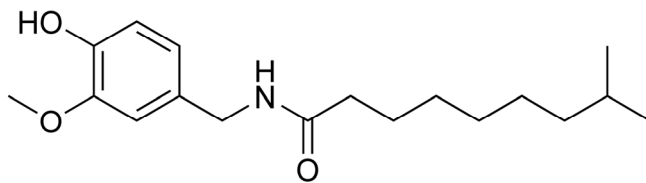
(2) 고추의 신미성분(Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate) 분석기술 확립 I
 Capsaicin & dihydrocapsaicin이외에 capsiate & dihydrocapsiate 분석을 위한 분석 조건을 확립하였다. 본 연구실에서는 기존 GC-MS를 이용한 capsiate & dihydrocapsiate 분석 조건을 확립하였으나 HPLC-UV에서도 분석이 가능하여 capsaicinoid 분석 조건을 확립하기 위한 실험을 진행하고 서비스를 지원하였다.

시료 추출방법의 경우 초기 분석방법 확립과정에서 태좌시료를 기준으로 하여 시료의 양이 적은 경우에도 분석이 가능하였다. 그러나 시료의 양이 많을수록 추출과정에서 발생할 수 있는 편차가 줄어들기 때문에 시료의 양을 늘려서 최적 추출방법을 재확립하였다.

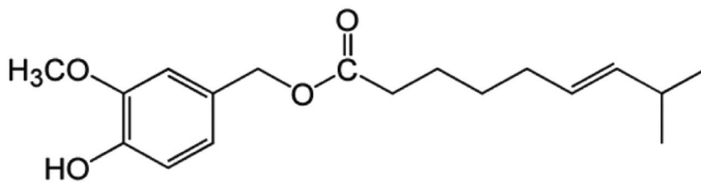
(가) Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate 구조식



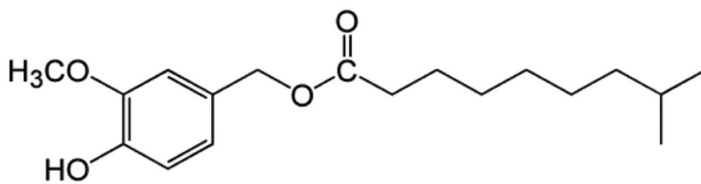
Capsaicin (C₁₈H₂₇NO₃)



Dihydrocapsaicin (C₁₈H₂₉NO₃)



Capsiate (C₁₈H₂₆O₄)



Dihydrocapsiate (C₁₈H₂₈O₄)

(나) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Varian 212/410/325 HPLC (USA)
- ② Detector : UV/VIS detector (Wavelength : 280nm)
- ③ Column : Phenomenex Luna C18 (250 X 4.60mm, 5 micron)

④ Mobile phase

- Solvent A : Acetonitrile
- Solvent B : DW + 0.1% formic acid
- Gradient program

Time(min)	%A	%B
0	70	30
10	70	30
30	100	0
35	100	0
40	70	30
50	70	30

⑤ Flow rate : 0.7 ml/min

⑥ Injection volume : 20 μ l

(다) 검량선 작성

Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate 각각 10mg을 취해 methanol 10 ml에 각각 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 만들었다. 이 용액을 methanol 용액으로 단계적으로 희석하여 50, 20, 10, 5, 2 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 18-21].

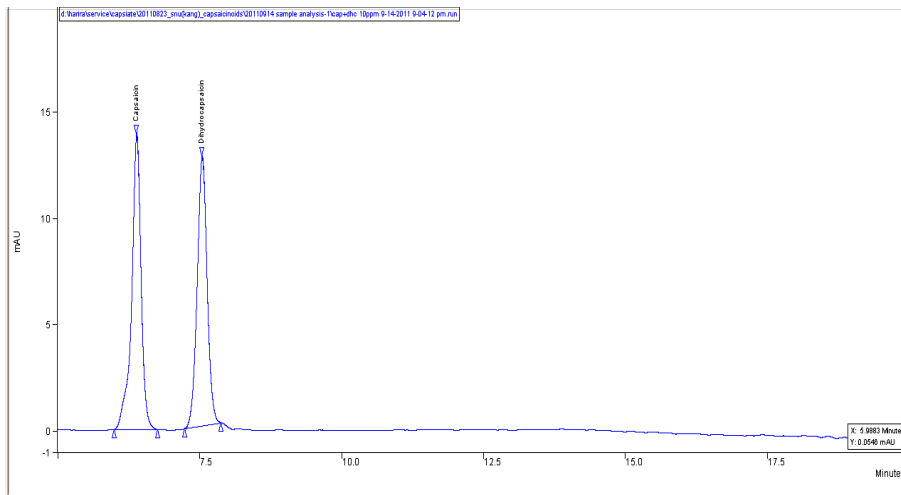


그림 18. Capsaicin 및 dihydrocapsaicin 표준용액 분석 결과 크로마토그램

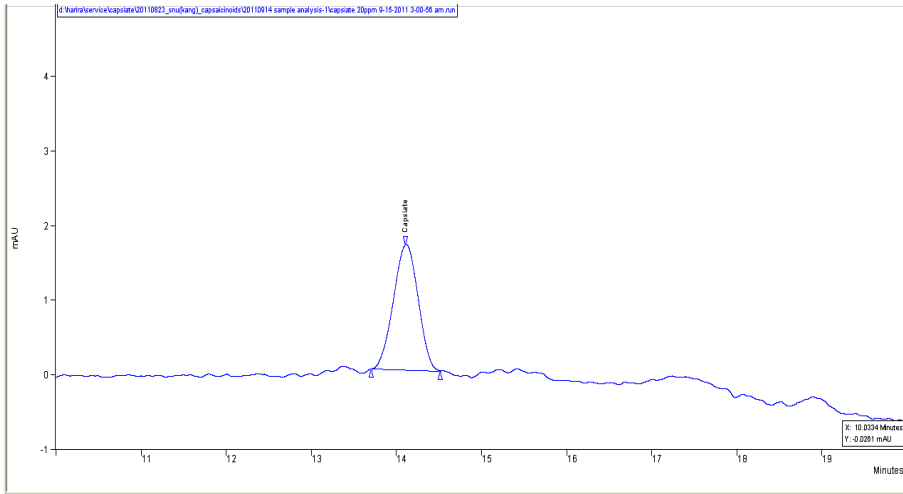


그림 19. Capsiate 표준용액 분석 결과 크로마토그램

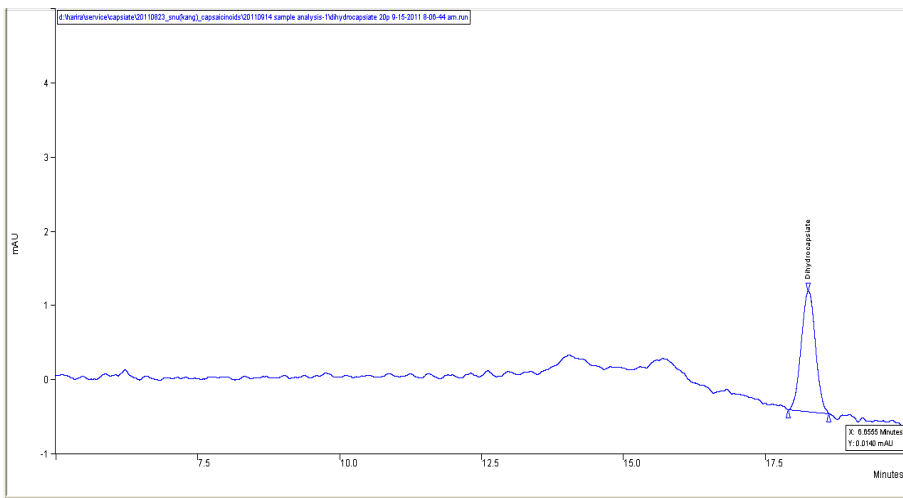
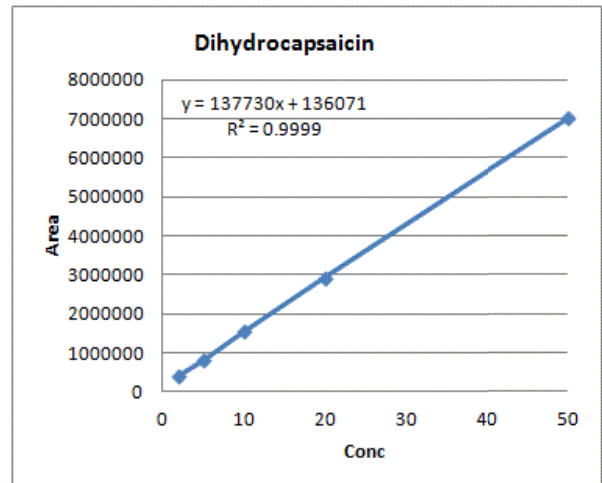
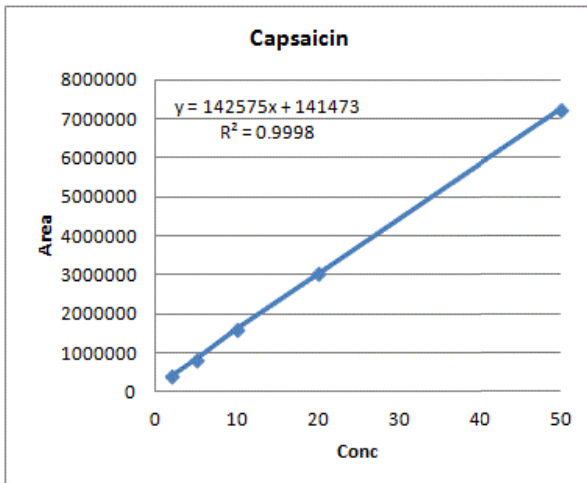


그림 20. Dihydrocapsiate 표준용액 분석 결과 크로마토그램



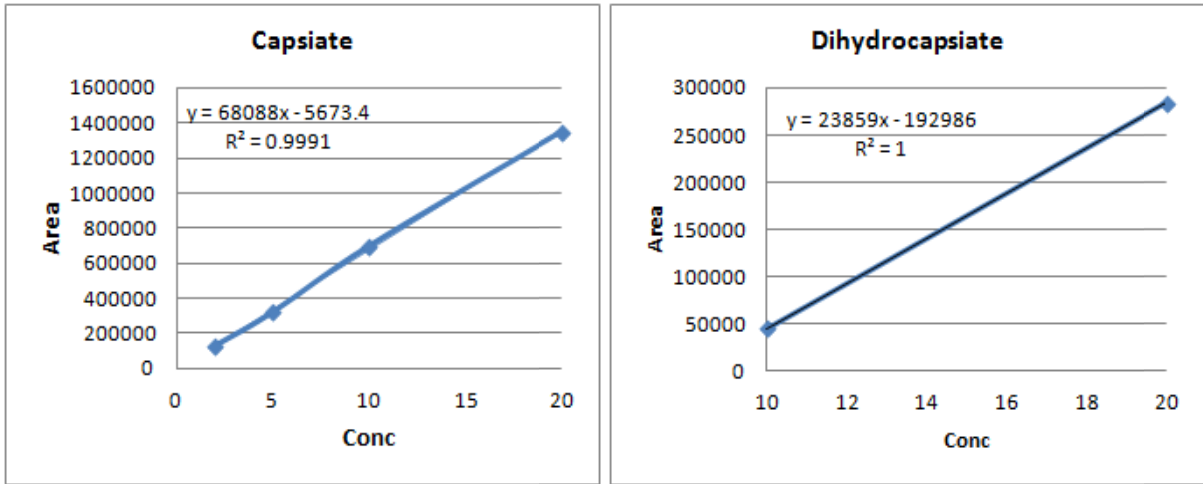


그림 21. Capsaicinoid (4종)의 검량선

(라) 시료의 추출

고추 1 g에 methanol 20 ml을 넣고 shaker에 고정 후 250 rpm에서 1시간 동안 추출하였다. 시료를 2,800 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 0.2 μ m PTFE syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 시료는 3반복 추출하였다[그림 22].

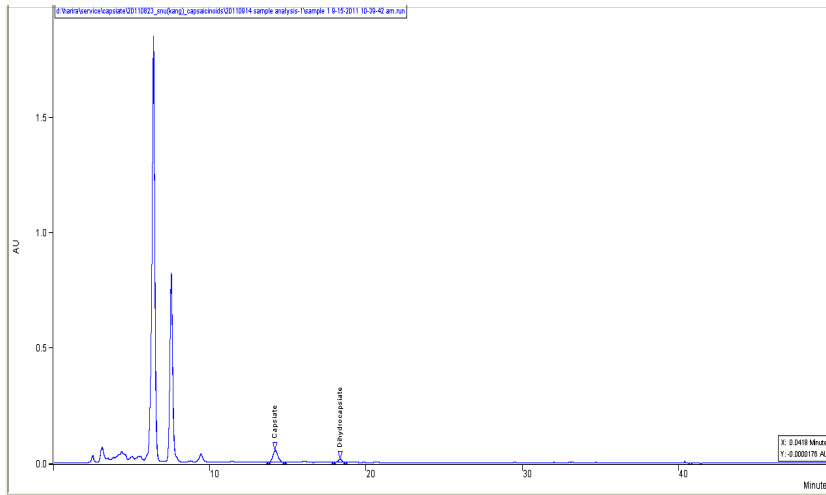


그림 22. 고추 시료 분석 결과 크로마토그램

(3) 고추의 신미성분(Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate) 분석기술 확립Ⅱ
 Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate의 동시 분석을 위한 기기분석 시간을 줄이고, 간단히 분석할 수 있는 방법으로 개선하여 분석 조건을 재확립하였다.

(가) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Agilent 1100 series (USA)
- ② Detector : UV/VIS detector (Wavelength : 280nm)
- ③ Column : Phenomenex Luna C18 (250 X 4.6 mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Methanol
 - Isocratic program : 80% methanol isocratic
- ⑤ Flow rate : 1.0 ml/min
- ⑥ Injection volume : 20 μ l

(나) 검량선 작성

Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate 각각 10mg을 취해 methanol 10 ml에 각각 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 만들었다. 이 용액을 methanol 용액으로 단계적으로 희석하여 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 23, 24].

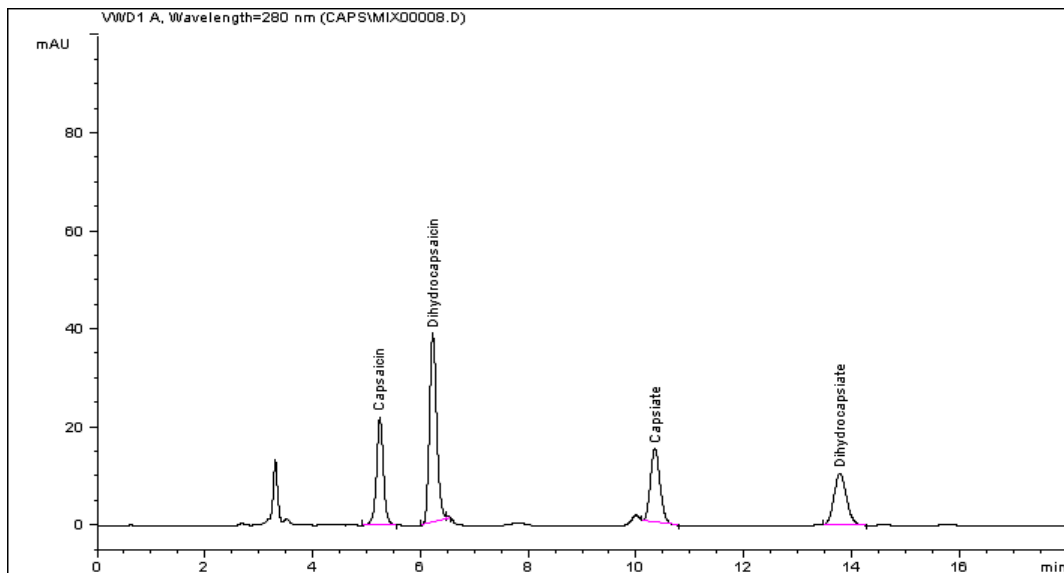


그림 23. Capsaicinoid (4종) 표준용액 분석 결과 크로마토그램

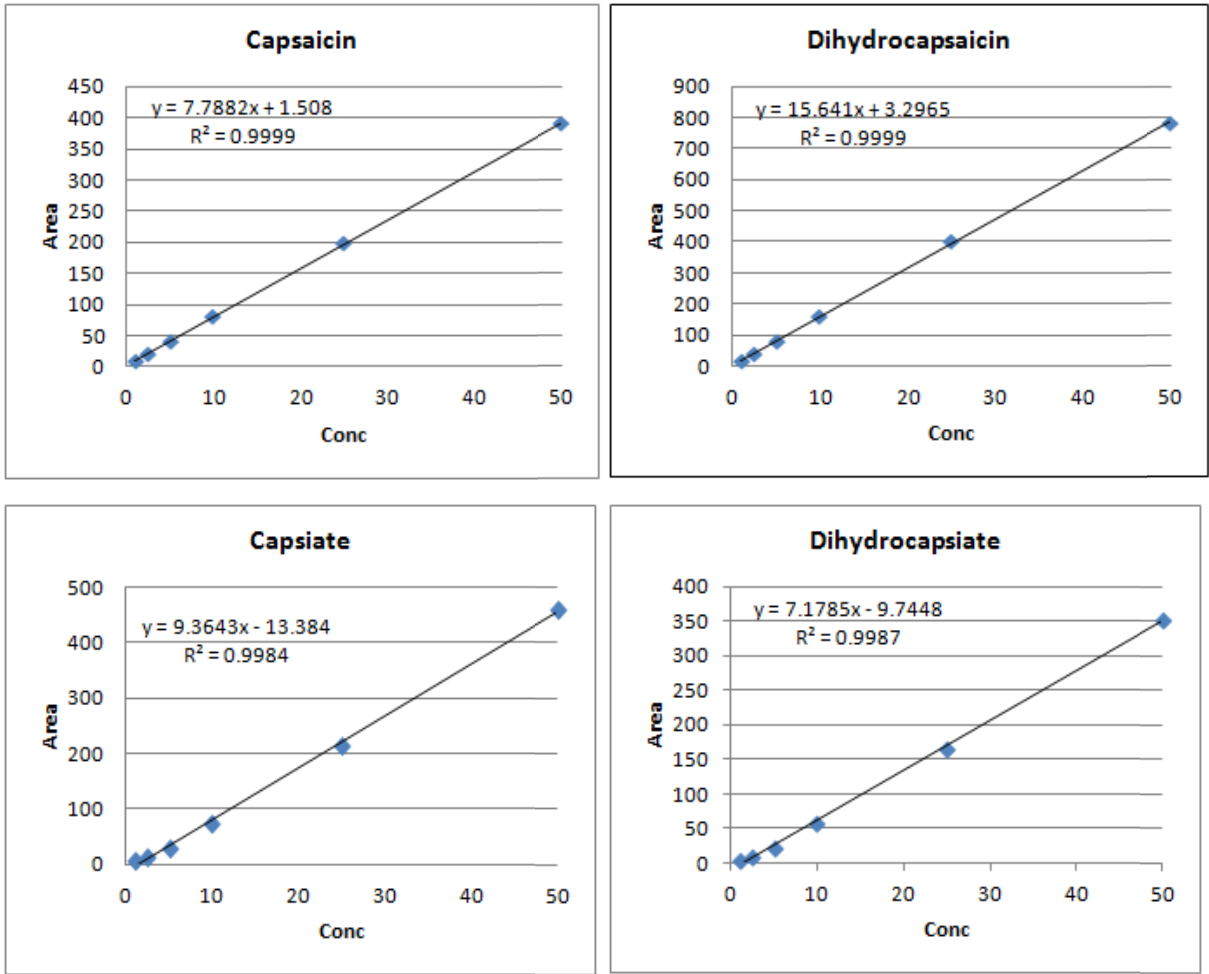


그림 24. Capsaicinoid (4종)의 검량선

(라) 시료의 추출

고추 또는 고춧가루 1 g에 methanol 20 ml을 넣고 shaker에 고정 후 250 rpm에서 1시간 동안 추출하였다. 시료를 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 0.2 μm PTFE syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다[그림 25].

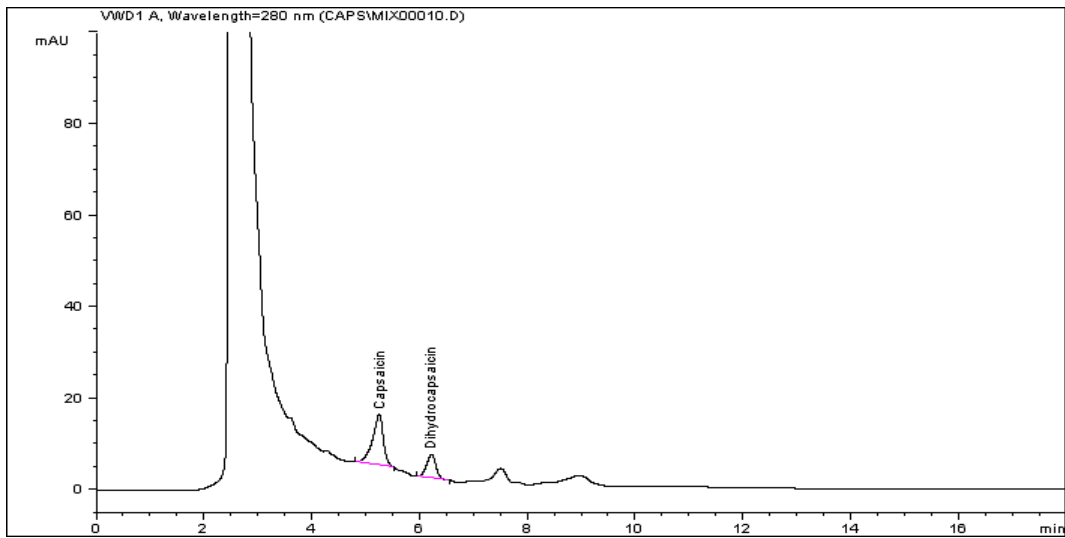


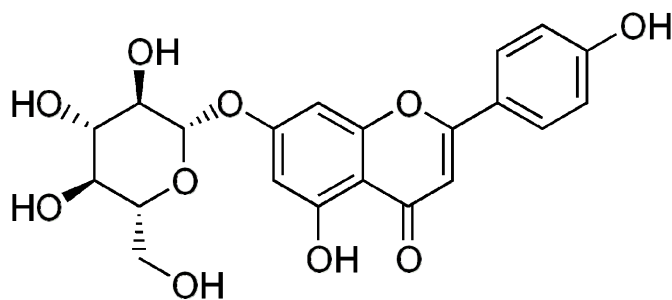
그림 25. 고춧가루 시료 분석 결과 크로마토그램

다. 파프리카의 apigenin-7-glucoside 성분 정밀분석법 확립

작물 육종 기관의 요구에 따라 파프리카의 apigenin-7-glucoside 성분의 정밀 분석법을 확립하고, 관련 생화학 성분 분석 서비스를 제공하였다.

Apigenin-7-glucoside은 바이오 플라보노이드(Bio Flavonoids)중의 하나로 dandelion coffee에서 처음으로 발견되었다. 주로 샬러리, 파슬리, 감국, 카모마일, 짚신나물 등에 존재한다. 식물에 존재하는 바이오 플라보노이드(Bioflavonoids) 성분으로 생물학적 활성을 갖고 있다. 최근 성분이 갖는 항산화 활성, 항바이러스, 항균, 항암, 항염, 항알레르기, 심장질환감소, 건강한 모세혈관 유지, 상처의 치유, 면역체계 강화, 세포의 콜라겐형성을 돕는 등의 효능 때문에 크게 주목받고 있다. 특히, 당뇨고추라 불리는 당조고추에 일반고추의 3~5배로 다량 함유되어 있어 혈당조절에 효과가 있어 당뇨, 비만증, 과당증 등 성인병 예방과 치료에 이용되고 있다.

(가) Apigenin-7-glucoside 구조식



Apigenin-7-glucoside (C₂₁H₂₀O₁₀)

(나) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Shimadzu HPLC (Japan)
- ② Detector : Shimadzu UV-VIS detector (Wavelength : 335nm)
- ③ Column : Shiseido C18 column (UG120, 250 X 4.6 mm, 5 micron)
- ④ Column oven temperature : 25℃
- ⑤ Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Acetonitrile

- Gradient program

Time(min)	%A(DW)	%B(ACN)
0	90	10
5	80	20
10	70	30
15	65	35
20	40	60
22.5	0	100
25	0	100
27.5	90	10
35	90	10

⑦ Flow rate : 0.8 ml/min

⑧ Injection volume : 20 μ l

(다) 검량선 작성

Apigenin-7-glucoside 표준품 10 mg을 methanol 10 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 methanol 10 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.3 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 26, 27].

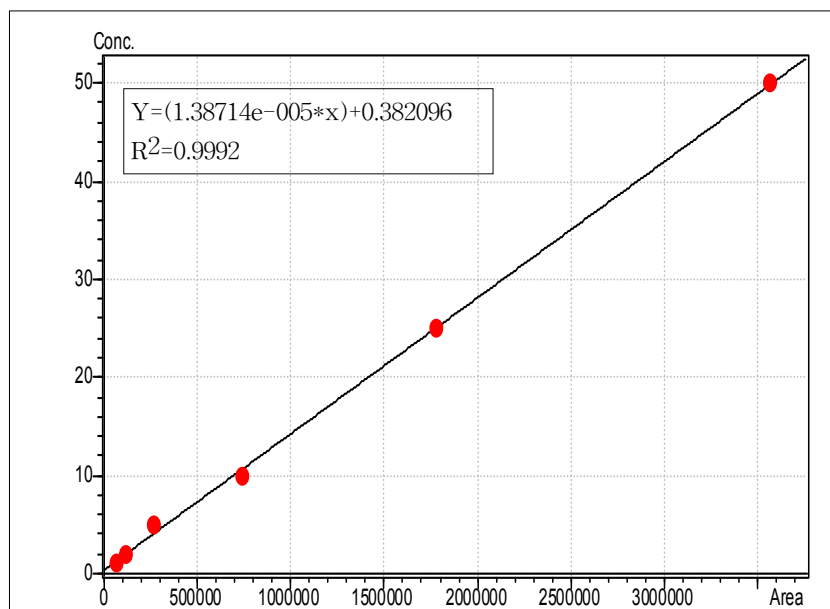


그림 26. Apigenin-7-glucoside 표준 검량선

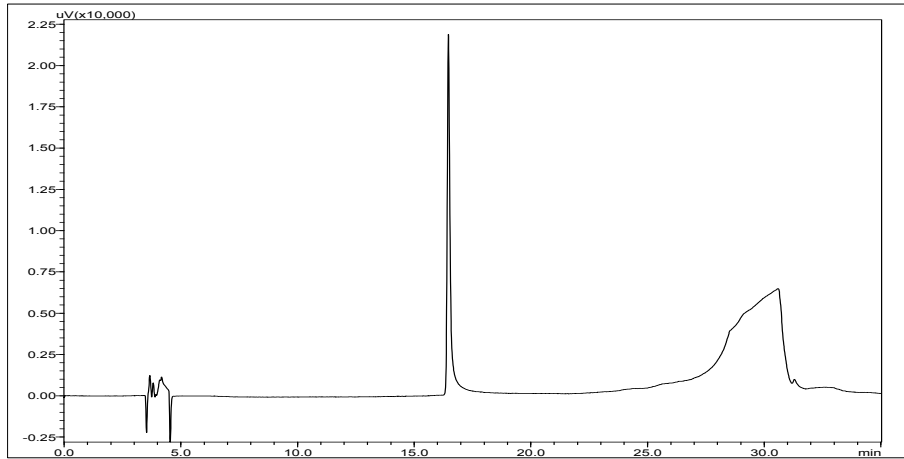


그림 27. Apigenin-7-glucoside 표준용액(5ppm) 크로마토그램

(라) 시료의 추출

- ① 파프리카 잎 : 시료 50 mg에 methanol 1 ml을 가하고 TissueLyser II (Retsch)에서 1초당 20회씩 20분 동안 추출하였다. 13,000 g에서 20분간 원심분리 후 상등액을 0.2 μ m PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 HPLC로 분석하였다[그림 28].
- ② 파프리카 과육 : 시료 50 mg에 methanol 1 ml을 가하고 TissueLyser II (Retsch)에서 1초당 20회씩 20분 동안 추출하였다. 13,000 g에서 20분간 원심분리 후 상등액을 0.2 μ m PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 HPLC로 분석하였다[그림 29].

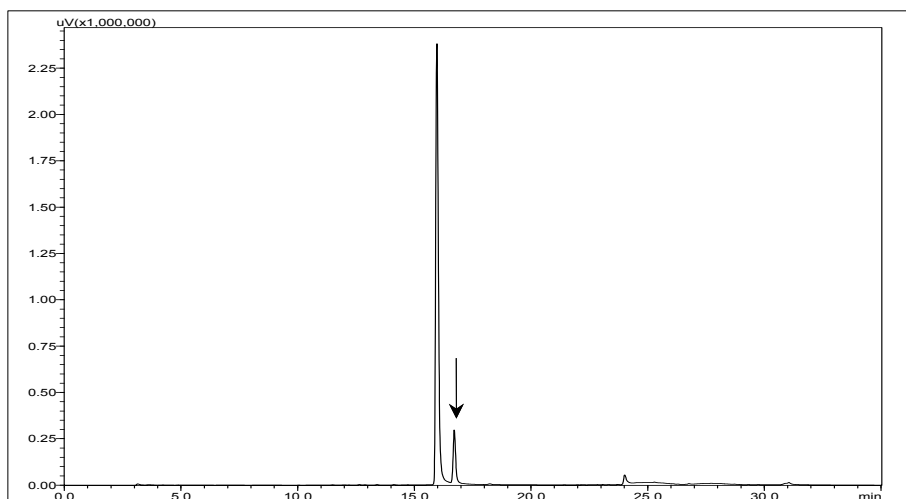


그림 28. 파프리카 잎 시료 분석 크로마토그램

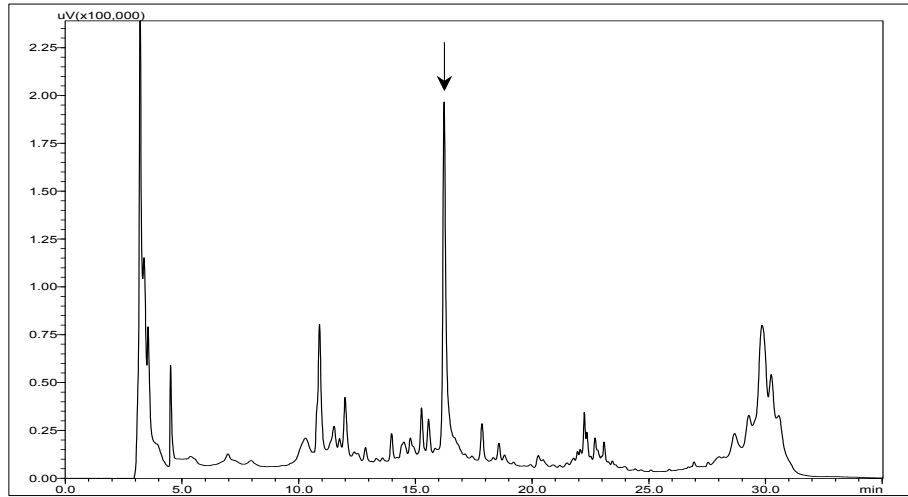


그림 29. 파프리카 과육 시료 분석 크로마토그램

(마) 파프리카의 apigenin-7-glucoside 함량 분석결과

파프리카 잎과 과육시료를 분석한 결과 apigenin-7-glucoside 함량은 대부분 과육보다는 잎에 많이 존재하는 것으로 나타났다. 예외적으로 17번 시료의 경우 과육에서 apigenin-7-glucoside 함량이 월등히 높게 나타난 것을 확인하였다[표 1].

표 1. Apigenin-7-glucoside 함량 ($\mu\text{g/g}$)

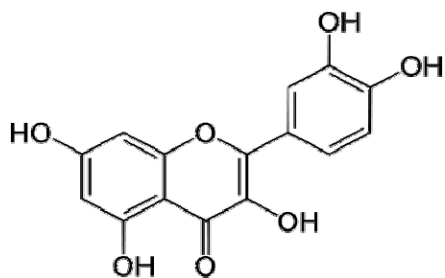
No.	잎	과육	No.	잎	과육
1	26.3	12.3	18	50.3	23.8
2	31.1	16.6	19	47.3	39.0
3	34.5	13.1	20	36.6	32.9
4	40.7	1.2	21	56.5	21.0
5	51.9	1.3	22	36.3	1.4
6	1179.4	1.4	23	44.1	6.9
7	31.6	27.6	24	36.1	1.1
8	54.3	13.2	25	33.8	11.9
9	2304.6	1.4	26	39.1	1.2
10	171.4	28.0	27	1980.6	12.6
11	238.5	1.3	28	1295.4	2.8
12	286.1	7.0	29	26.8	1.6
13	287.4	1.2	30	375.5	12.4
14	64.0	3.2	31	1315.2	12.3
15	319.9	1.4	32	1442.0	11.8
16	21.3	1.2	33	1258.8	12.7
17	32.4	233.0	34	1050.4	12.4

라. 양파의 Quercetin 성분 분석법 확립

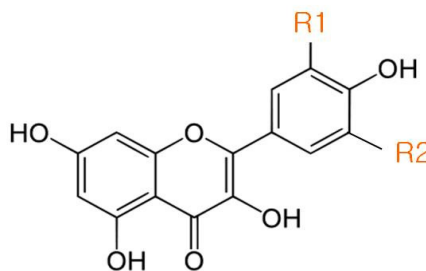
작물 육종 기관의 요구에 따라 양파의 Quercetin 성분의 분석법을 확립하고, 관련 생화학 성분 분석 서비스를 제공하였다.

양파 껍질에 많이 함유된 flavonoid계 일종(flavonol group)인 quercetin은 강력한 항산화제로 세포의 손상을 막아 고혈압 예방 및 노화방지 효과 등 다양한 효능이 있다. 양파 이외에도 포도, 녹차, 키위 등 야채와 과일에 많이 함유되어 있다.

(가) Quercetin 구조식



Quercetin(C₁₅H₁₀O₇)



Flavonids

(나) 화학적 특성

- ① 분자량: 302.2 g/mol
- ② 정상 : 황색분말
- ③ 용점 : 316 °C
- ④ 용해도 : Water (Not available), Ethanol (Insoluble)

(다) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Varian ProStar 230/410/330 LC (US)
- ② Detector : Varian ProStar 330 (Wavelength : 380nm)
- ③ Column : Luna C18 (250 X 4.60mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Methanol + 0.1% formic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% formic acid
 - Gradient program

Time(min)	%A	%B
0	10	90
5	10	90
30	80	20
40	80	20
45	10	90
60	10	90

- ⑤ Flow rate : 0.8 ml/min
- ⑥ Injection volume : 10 μl

(라) 검량선 작성

Quercetin dehydrate 10 mg을 90% methanol 10 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 90% methanol 10 ml로 정용 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 50, 20, 10, 5, 2, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 10 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 30, 31].

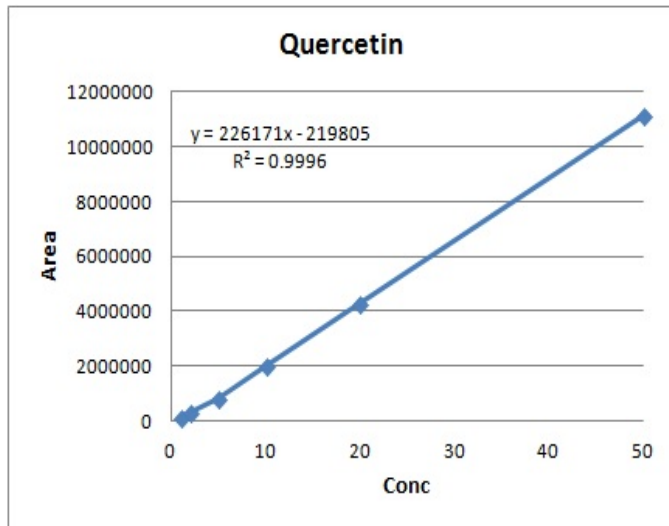


그림 30. Quercetin 표준용액 검량선

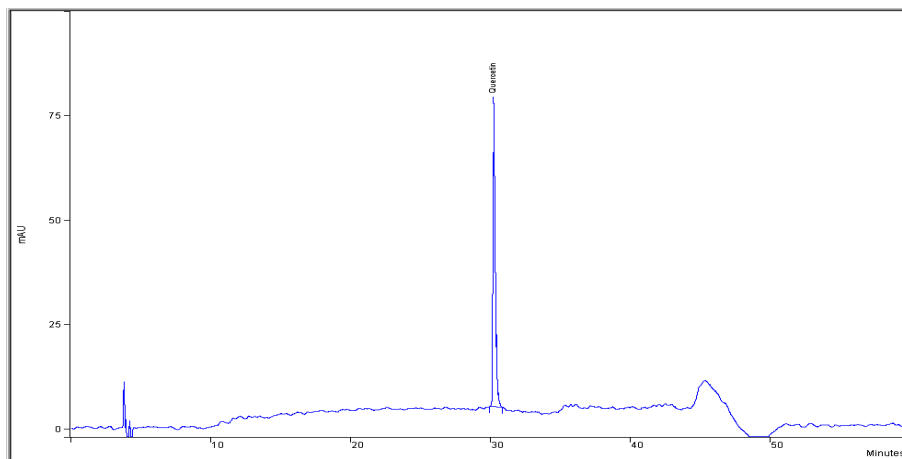


그림 31. Quercetin 표준용액(20ppm)의 분석 결과 크로마토그램

(마) 시료의 추출

양과 시료 5 g에 90% methanol 20 ml을 넣고 high-speed homogenizer로 1분간 분쇄하였다. 시료가 담긴 tube를 shaker에 넣고 250 rpm에서 2시간 동안 추출하였다. 시료를 2,800 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 0.2 μ m PVDF syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

(바) 양과 시료의 분석 결과 함량 및 크로마토그램

양과의 품종별 시료 분석 결과는 표 2와 같다. Quercetin 함량이 검출되지 않은 시료도 있고, 100 ug/g 이상의 함량을 나타내는 시료도 있었다. 분석 결과 크로마토그램을 보면 quercetin 성분 이외에도 unknown peak들이 많이 나타나는데 다른 종류의 flavonoid 성분들로 예상된다[그림 32].

표 2. 양과의 종류별 quercetin 함량

시료 종류	Quercetin함량 ($\mu\text{g/g}$ FW)	시료 종류	Quercetin함량 ($\mu\text{g/g}$ FW)
1	18.80	18	127.89
2	13.88	19	15.19
3	0.00	20	25.13
4	46.34	21	10.15
5	47.99	22	20.36
6	18.41	23	27.86
7	17.37	24	12.86
8	5.10	25	32.27
9	29.65	26	20.55
10	148.31	27	28.72
11	20.92	28	17.56
12	35.81	29	35.93
14	60.85	30	19.16
15	20.05	31	11.12
16	9.74	32	60.50
17	25.94	33	17.07

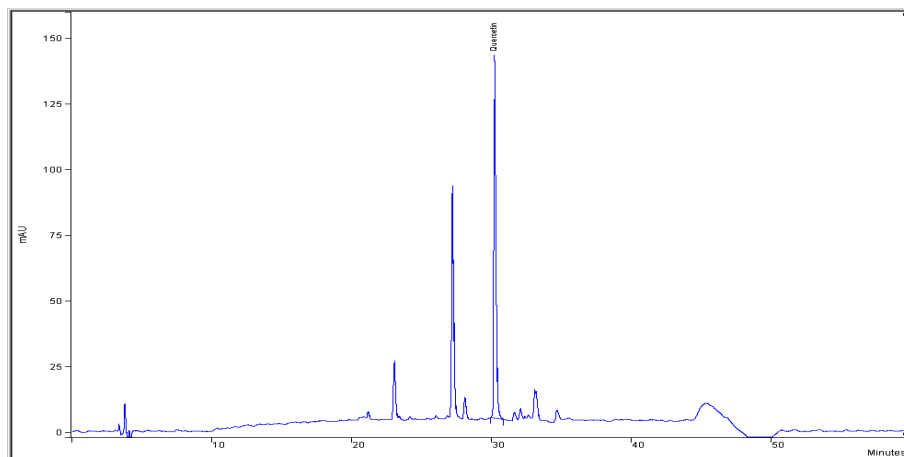


그림 32. 양과 시료 분석 결과 크로마토그램

3. 작물 품질 육종을 위한 생화학 성분 분석 기술 지원 서비스

가. 차별화된 분석기반 확립

작물에 따라 기능성/생리활성 생화학 성분의 종류는 수 개에서 수십 개, 수백 개가 존재하는 것으로 알려져 있기 때문에 기능성 성분을 이용한 작물 육종의 연구 가능성은 매우 크다.

최근 건강한 식습관에 대한 관심이 높아지면서 기능성/생리활성 생화학 성분을 많이 함유하고 있는 작물에 대한 수요가 늘어감에 따라 기능성/생리활성 생화학 성분이 강화된 작물 품종을 육종하기 위한 연구가 활발히 진행 중이다. 하지만 국내에서 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 지원 서비스를 전문적으로 수행하는 기관이 없거나 민간육종가나 소규모 종자회사의 경우 고가의 분석 수수료가 부담되어 기능성/생리활성 생화학 성분에 대한 품질 육종 연구가 활성화되지 못하고 있다.

품질 육종 연구를 활성화하기 위해서는 기존 품종 중에서도 생리활성을 인정받은 다양한 기능성/생리활성 생화학 성분을 정밀하게 분석하기 위한 분석기술이 필요하다.

국내 다양한 분석기관에서 일반성분을 비롯한 일부 기능성 성분 서비스를 제공하고 있지만 대부분 단일성분을 분석하거나 분석기술이 확립되지 않은 실정이다.

본 연구에서는 일반적인 단일성분 분석법을 지양하고, 다성분 동시 분석기술을 확립하여 타 분석기관과 차별화된 분석기술을 개발하였다[표 1]. 타 분석기관에서 제공 중인 생화학 성분 분석 서비스 현황과 비교하였을 때 anthocyanin, resveratrol, capsiate & dihydrocapsiate, glucosinolates, apigenin-7-glucoside, quercetin, ginsenosides, eleutherosides 등의 타 기관에서 제공하지 않는 중요 기능성/생리활성 생화학 성분 분석기술을 확립하였다. HPLC, GC 뿐만 아니라 GC-MS, HPLC-MS/MS 등 고가 첨단 분석 장비를 활용하여 결과의 신속성, 신뢰성, 정밀성을 제고하였다. 또한, 산·학·관·연·민 등 육종 단체의 수요를 적극 반영하며 품질 육종연구의 활성화에 기여하였다.

표 1. 타 기관과 차별화된 분석법 확립

분류	본 연구에 의한 분석법 확립	타 분석기관 서비스 제공 현황 비교
1	아미노산 28종 동시다성분 분석	기본 11~18종 동시분석 제공
2	Lycopene, β -carotene 동시 분석	단성분 분석
3	Isoflavone (7종) 동시다성분 분석	주로 genistein과 daidzein 성분만 분석
4	Anthocyanin (7종) 동시다성분 분석	분석 가능한 곳은 anthocyanidin만 분석
5	Resveratrol 분석	분석서비스 제공 기관 없음
6	Capsaicinoids (4종) 동시다성분 분석	주로 capsaicin만 분석 Capsiate와 dihydrocapsiate 분석서비스 제공 기관 없음
7	Glucosinolates (11종) 동시다성분 분석	분석서비스 제공 기관 없음
8	Apigenin-7-glucoside 성분 분석	분석서비스 제공 기관 없음
9	Quercetin 성분 분석	분석서비스 제공 기관 없음
10	Ginsenosides (15종) 동시다성분 분석	분석서비스 제공 기관 없음
11	Eleutherosides (2종) 동시 분석	분석서비스 제공 기관 없음

나. 생화학 성분 분석 지원 서비스 현황 (2009~2014년)

1~5차년도에 확립된 생화학 성분 분석기술을 이용하여 다양한 작물별 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 서비스를 제공하였다. 민간육종가, 대학, 연구소, 식품회사 등 20개 기관에서 서비스를 의뢰하였고, 24개 작물에서 생화학 성분 21종을 정량·정밀 분석하여 그 결과를 제공하였다. 2009년부터 2014년 04월까지 제공된 서비스는 총 7,441점이고 서비스 부분 목표량을 초과달성하였다[표 2].

연차별 서비스 현황을 보면 주로 수박의 lycopene, 고추의 capsaicin & dihydrocapsaicin, 베리류의 anthocyanin 성분이 가장 많이 분석되었고, β -carotene, GABA, resveratrol 등의 성분들도 분석되었다. Carotenoid, capsaicinoid, anthocyanin, GABA, resveratrol에 대한 수요는 지속적으로 늘어나는 추세이다. 그 이외에도 당류, isoflavone, quercetin 등의 성분 분석 서비스가 지원되었다.

본 연구 과제를 통해 다양한 작물별 기능성/생리활성 생화학 성분들을 정량·정밀 분석 서비스 할 수 있는 시스템을 구축하였다. 체계화된 지원 서비스를 통해 민간육종가와 종자회사의 기능성 성분 강화 작물 육종의 성공여부를 결정하는데 도움을 주고, 생화학 성분 분석에 대한 연구를 활성화하여 궁극적으로 작물의 부가가치를 증진시키는데 기여하였다.

표 2. 생화학 성분 분석 지원 서비스 현황 (2009~2014년)

연도	번호	의뢰 기관	서비스 제공 내용		
			작물	분석성분	분석 점수
1차 년도	1	A	수박	Lycopene	439
	2	A	호박, 멜론	β-Carotene	26
	3	B	고춧가루	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	71
	4	C	쌀	GABA	75
2차 년도	1	A	파프리카	Apigenin-7-glucoside	174
	2	A	수박	Lycopene	424
	3	D	고추	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	60
	4	E	고추	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	65
	5	F	고추	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	498
	6	G	블랙초크베리	Anthocyanin (6종)	17
3차 년도	1	E	고추	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	43
	2	F	고추	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	225
	3	H	수박	Lycopene	288
	4	I	현미효소	γ-aminobutyric acid (GABA)	31
	5	J	양파	Quercetin	87
	6	E	고추	Capsiate	16
	7	A	멜론	β-Carotene	29
	8	E	고추	Capsaicin/Dihydrocapsaicin/ Capsiate/Dihydrocapsiate	227
	9	D	고추	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	23
	10	H	수박	Lycopene	263
	11	F	고추	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	89
	12	F	고추	Capsaicin & Dihydrocapsaicin	130
	13	T	쌀	Sugar(5종)	23
4차 년도	1	K	땅콩나물	Resveratrol	19
	2	I	현미, 현미효소제품	γ-aminobutyricacid(GABA)	65
	3	K	땅콩나물	Resveratrol	41
	4	I	구지뽕+현미시료	γ-aminobutyricacid(GABA)	25
	5	C	거대배아미시료	γ-aminobutyricacid(GABA)	21
	6	L	배추	Lycopene, β-carotene	46
	6	L	토마토	Lycopene, β-carotene	22
	7	F	고추	Capsaicin, dihydrocapsaicin, sugar(5종)	99
	8	Q	수박	Lycopene, β-carotene	76
	9	H	수박	Lycopene	194
	10	G	베리, 복숭아	Anthocyanin(7종)	189
	11	M	복숭아	Anthocyanin(7종)	182
	12	M	복숭아	Lycopene, β-carotene	30
	13	J	양파	Quercetin	22
	14	N	당근	Lycopene, β-carotene	48
15	A	수박	Lycopene	87	
5차 년도	1	C	벼 종자	Sugar(5종)	182
	2	O	감귤	Sugar(5종)	103
				Lycopene, β-carotene	74
				Anthocyanin (7종)	77
	3	P	콩나물	Isoflavone (6종)	1,432
	4	Q	수박, 막걸리, 와인	Sugar(5종)	255
				Lycopene	108
	5	R	토마토	Lycopene	206
	6	H	수박	Lycopene	66
7	A	수박	Lycopene	345	
8	G	베리	Anthocyanin (7종)	38	
9	S	발아현미제품	GABA	66	
총 계		기관 20개	작물 24개	성분 21종	7,441점

다. 타 분석기관과의 분석비용 비교

작물의 기능성 성분에 대한 관심이 높아지면서 국내에서 성분 분석 서비스를 하는 기관에 대한 문의도 많아지고 있다. 그러나 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 기술을 개발하기 위해서는 고가의 정밀 분석 장비가 구비되어 있어야 하고 그러한 시스템을 갖춘 연구기관은 많지 않다. 특정 성분에 대한 정밀 분석이 가능하더라도 분석비용이 비싸기 때문에 많은 개인 육종 연구자들에게 부담이 되고 있다. 또한, 전처리가 불가능하고 오직 분석만 가능한 기관도 있다.

본 사업단의 경우 타 기관에 비해 최대 7배 정도 낮은 분석 수수료를 제공할 뿐 아니라 첨단 분석기기를 이용한 정량분석으로 질 높은 서비스를 제공하고 있다[표 3].

라. 분석비용 절감효과 (육종단체 연구/실용화 비용 절감)

본 과제를 통하여 외부 분석기관보다 저렴한 분석비용으로 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 서비스를 제공하여 육종단체의 연구/실용화 비용을 절감하였다.

1~5차년도 분석 의뢰 샘플수를 기준으로 타 기관의 분석비용과 사업단의 분석비용을 비교하여 서비스 비용의 절감 효과를 비교해 보았다. 그 결과 5년 동안 타 분석기관이 아닌 본 작물육종지원사업단에서 서비스를 이용하였을 때 약 2억 6천만원 이상의 절감효과가 있었다[표 4].

타 기관보다 저렴한 비용으로 정밀분석 서비스 결과를 제공할 수 있었던 것은 정부 지원으로 추출비용과 기기분석비용을 50%이상 낮추고 최소비용만 수수료로 책정했기 때문이다. 앞으로 다양한 작물별 기능성 품질 육종 연구를 활성화하기 위해서는 작물육종지원사업단과 같은 육종전문가들을 위한 전문적인 서비스 기관이 유지되어야 하고, 민간육종가들의 분석 수수료에 대한 부담을 줄이기 위한 지속적인 정부차원의 지원이 필요할 것이다.

표 4. 서비스 지원에 의한 육종단체 연구/실용화 비용 절감 효과

서비스 점수	분석비용 절감 금액/점	총 절감 금액
7,441점	36,000원	2억 6천여 만원

* 분석 수수료: 본 사업단 14,000원 , 타기관 평균 50,000원 기준(기본료와 부가세 및 기타 수수료는 제외하고 성분별 수수료만을 계산)

표 3. 분석기관별 생화학 성분 분석 서비스 수수료 비교

구분	검사항목	분석 수수료 (단위 : 원)					작품유종지원사업단 기본료, VAT 없음
		A 기관	B 기관 (VAT 별도) 기본료는 없으나 반복 분석 비용 추가 발생	C 기관 (VAT 별도)	D 기관 (VAT 별도)	E 기관 (VAT 별도)	
기본료	기본료	60,000	기본료는 없으나 반복 분석 비용 추가 발생	60,000	65,000	없음	기본료, VAT 없음
	HIS, ILE, LEU, LYS, MET, CYS, PHE, TYR, TRP, THR, VAL (14종)	-	-	-	동시다분석: 300,000 (개별항목:75,000)	-	-
Amino acid	ALA, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, CYS, PHE, TYR, TRP, THR, VAL, ASN, SER, GLN, GLU, PRO, ARG (18종)	200,000	150,000	150,000	-	146,800	-
	HIS, ILE, LEU, LYS, MET, CYS, C-C, PHE, TYR, TRP, THR, VAL, ASN, SER, GLN, GLU, PRO, ARG, GLY, ALA, AAA, SAR, β-AIB, αILE, NORV, ASP, HYP, ORN (28종)	-	-	-	-	-	100,000
Carotenoid	GABA	-	-	-	100,000	-	50,000
	Lycopene	-	-	35,000	-	-	14,000
Flavone	β-Carotene	-	99,000	99,000	100,000	76,900	14,000
	Apigenin	-	-	-	-	-	14,000
Flavonol	Quercetin	-	-	-	-	-	14,000
	Daidzein	-	Daidzein 및 Genistein 분석: 140,000	Daidzein 및 Genistein 분석: 140,000	85,000	-	-
Isoflavone	Genistein	-	Daidzein 및 Genistein 분석: 140,000	Daidzein 및 Genistein 분석: 140,000	-	-	-
	Glycitein	-	Daidzein 및 Genistein 분석: 140,000	Daidzein 및 Genistein 분석: 140,000	-	-	-
Capsaicinoid	Daidzin	-	-	-	-	-	-
	Genistin	-	-	-	-	-	-
Capsaicinoid	Glycitin	-	-	-	-	-	-
	Capsaicin	동시다분석: 100,000	-	-	85,000	30,000	동시다분석: 14,000
Anthocyanin	Dihydrocapsaicin	-	-	-	-	-	-
	Capsaicin/Dihydrocapsaicin	-	-	-	-	-	-
Glucosinolates	Delphinidin-3-glucoside, Cyanidin-3-glucoside, Cyanidin-3-galactoside, Petunidin-3-glucoside, Pelargonidin-3-glucoside, Peonidin-3-glucoside, Malvidin-3-glucoside (7종)	-	-	-	-	-	-
	Simigrin 외 10종	-	동시다분석: 100,000 (개별항목:60,000)	-	-	-	동시다분석: 50,000
Sugar	Lactose	-	110,000	-	50,000	-	-
	Glucose	-	-	-	50,000	-	-
Organic acid	Sucrose	-	-	동시다분석: 100,000 (개별항목:60,000)	50,000	동시다분석: 70,000	-
	Fructose	-	-	-	50,000	-	-
Stilbene	Maltose	-	-	-	50,000	-	-
	Raffinose	110,000	-	-	-	-	-
Ginsenosides	Tartaric acid, Citric acid, Malic acid, Fumaric acid, Succinic acid, Lactic acid, Acetic acid (7종)	-	-	-	동시다분석: 200,000 (개별항목:75,000)	-	동시다분석: 50,000
	Resveratrol	-	-	70,000	-	-	50,000
Eleutheriosides	Re, Rg1, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rg2S, Rg2R, Rh1S, Rh1R, Rd, Rg3S, Rg3R, Rh2S, Rh2R (15종)	-	-	70,000	-	-	동시다분석: 14,000
	Eleutherioside B, Eleutherioside E	-	-	70,000	-	-	동시다분석: 14,000

4. 분석법 표준화 SOP (Standard Operating Procedures) 마련

* 2009년부터 2014년까지 작물 품질 육종을 위해 확립된 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 기술을 바탕으로 분석법의 표준분석지침서(SOP)를 마련하였다.

별첨4. 작물육종지원사업단 성분 분석법 표준화 SOP 참조.

3절 고추에서 분자마커 분석 서비스 지원 및 TMV 저항성 L 유전자좌와 매운맛 함량 조절 유전자 연관 마커 개발 (제 1-3 세부과제)

1. 고추 분자표지 분석 지원 서비스

가. 국내외 종자회사를 대상으로 마커분석 지원

(1) 년차별 분석지원 목표 및 달성률

고추의 형질 연관 마커(응성불입성, 병 저항성 및 매운맛 등 20여 가지)를 이용하여 국내외 종자회사((주)농우바이오, NH종묘센터, 농업회사법인아시아종묘(주), 바이엘크롭사이언스 누넴사업부, 사카타코리아(주), 삼성종묘(주), 제일종묘농산(유), 한국다끼이(주), 농업유전자원센터 등)을 대상으로 마커분석 지원 서비스를 수행하였다. 매년 계획했던 목표량을 지속적으로 상회하여 최종 목표량 대비 39.2%(21,613 점)를 초과달성하였다(표 1).

표 1. 년차별 분석지원 목표 및 달성률

구분	분석 서비스 점수	
	목표	달성
1차년도	5,000	10,991
2차년도	8,000	13,307
3차년도	14,000	18,098
4차년도	14,000	16,087
5차년도	14,000	18,130
계	55,000	76,613

(2) 분자표지별 서비스 내역

분석의뢰자들의 정보 미공개 요구에 따라 회사별 분석 마커 종류 및 점수에 대해서는 구체적으로 밝힐 수는 없으나, 지난 5년간 수행한 내용은 다음과 같다. 분석의뢰가 가장 많았던 마커는 역병 저항성 마커로 총 36,256점을 분석하였고, 다음은 GMS와 CMS 관련 분자표지[ms_k 마커(15,173점) Rf 마커(14,373점), $ms1$ 마커(389점), $ms3$ 마커(87점)]로 총 30,022점을 분석하였다. 세 번째로 분석의뢰가 많았던 분자표지는 CMV 저항성 마커와 매운맛 유무 판별용 $pun1$ 마커로 각각 1,897점과 1379점을 분석하였다. 이외에도 포티바이러스 저항성 마커[$Pvr4$ 마커(807점)와 $pvr2$ 마커(327점)], TMV 저항성 마커[L 마커(223점), L^3 마커(655점), L^4 마커(706점)], 그리고 순도검정과 세균성반점병 저항성 마커를 포함한 기타 마커(1054점)에 대한 분석 서비스를 수행하였다(표 2).

이상의 결과에서 역병저항성 마커분석 수는 해년 증감을 반복하였으나 다른 마커에 비해 분석요구도가 매우 높았고, 종자 생산과 관련한 msk , Rf , $ms1$, $ms3$ 마커의 경우 총

분석량에서는 역병마커와 함께 고추품종 육성에 매우 중요한 분자표지인 것으로 판단되었다. 한편, 탄저병 저항성 마커와 CMV 저항성 마커의 수요정도가 올해부터 증가하고 있는데, 이는 최근 고추의 육성 경향과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 판단되었다.

표 2. 분자표지별 서비스 내역

연차	총 분석수량 (점)	고추 형질 연관 마커													
		역병	msk	Rf	탄저병	CMV	Pun1	Pvr4	L ⁴	L ³	ms1	pvr2	L	ms3	기타
1차년도	10,991	5,076	2,067	2,271	0	280	0	0	369	29	389	300	196	14	0
2차년도	13,307	6,349	2,681	1,994	746	84	55	534	194	27	0	27	27	73	516
3차년도	18,098	9,853	3,101	2,840	718	343	442	225	143	0	0	0	0	0	433
4차년도	16,087	6,113	5,545	2,656	790	60	882	30	0	0	0	0	0	0	11
5차년도	18,130	8,863	1,779	4,613	1,034	1,130	0	18	0	599	0	0	0	0	94
합계	76,613	36,254	15,173	14,374	3,288	1,897	1,379	807	706	655	389	327	223	87	1,054
비율	100%	47%	20%	19%	4%	2%	2%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	1%

2. 고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자 판별 마커 세트 개발

가. TMV 저항성 L 유전자좌와 연관된 분자마커의 확보 및 염기서열 분석

최근 타 연구 그룹에서 L 유전자 클로닝을 위한 fine mapping 및 BAC screening 논문 두 편을 출판하였다. Tomita 등(2009, Theor. Appl. Genet. 117:1107-1118)과 Yang 등(2009, Mol Breeding DOI 10.1007/s11032-009-9304-9) 논문에서 L 유전자와 연관된 염기서열을 확보하여 다양한 프라이머를 디자인하였다. 이를 바탕으로 ECW(L⁺), Tisana(L¹), CM334(L²), PI159236(L³) 및 PI260429(L⁴)에 대해 PCR을 수행하고(그림 1과 2) 염기서열 분석하였다.

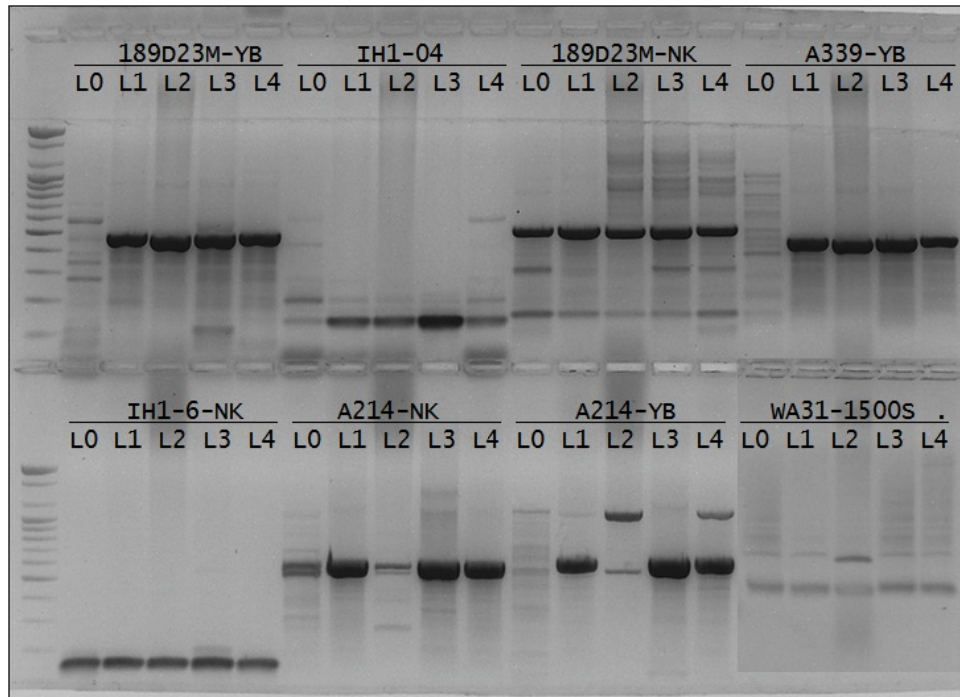


그림 1. Tomita 등(2009)에서 보고한 *L* 유전자와 연관 염기서열을 바탕으로 디자인한 프라이머를 이용한 PCR 반응.

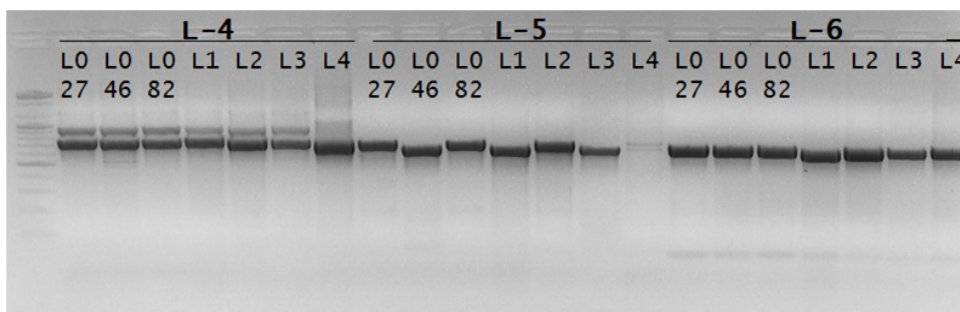


그림 2. Yang 등(2009)에서 보고한 *L* 유전자와 연관 염기서열을 바탕으로 디자인한 프라이머를 이용한 PCR 반응.

- 나. 이병성(L^+) 및 저항성 대립유전자(L^1 , L^2 , L^3 및 L^4) 특이적인 분자마커 개발
 위 실험에서 얻은 염기서열을 바탕으로 InDel이 있는 경우는 공우성 SCAR 분자표지 (예: L^1 -SCAR, L^3 -SCAR 및 L^4 -SCAR)로 개발하였고, 특정 제한효소 자리에 SNP가 있는 경우는 CAPS 분자표지(예: L^2 -CAPS)로 개발하였다(그림 3).

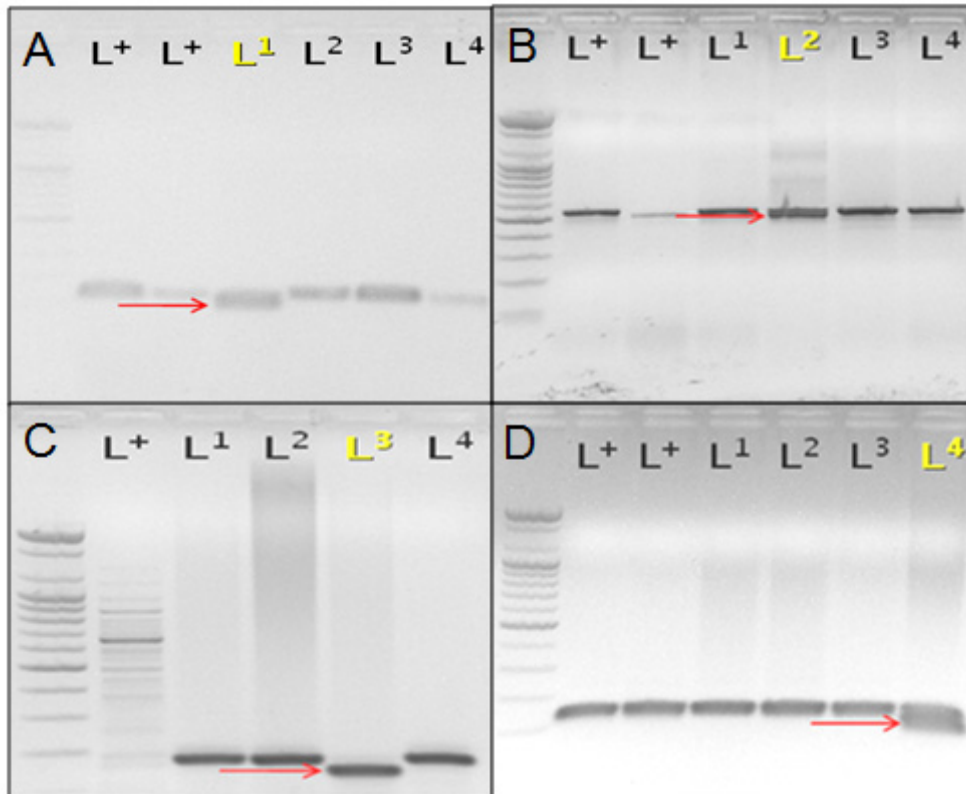


그림 3. 고추 TMV 저항성 대립유전자 특이적인 분자표지인 L^1 -SCAR(A), L^2 -CAPS(B), L^3 -SCAR(C) 및 L^4 -SCAR(D) 전기영동 사진.

1차년도에 L^4 , L^3 및 L^1 특이적인 공우성 분자표지 개발을 완료하였으나, L^2 에 대해서는 우성 분자표지 밖에 개발하지 못하였다. 따라서 2차년도에는 L^+ 와 L^2 를 구분할 수 있는 공우성 분자표지 개발을 하려고 하였다. L_2 -CAPS 분자표지를 다양한 유전자원에 분석한 결과 그림3-1과 같이 L^2 대립유전자는 두 개의 밴드를 나타내고 있는 반면, L^+ 대립유전자는 밴드 증폭이 안 되거나(L^+ -27) 위 밴드만 있거나(L^+ -46) 아래 밴드만 있거나(L^+ -82) 하는 등 최소한 3가지 이상의 대립유전자가 있을 것으로 생각되었다(그림 4).

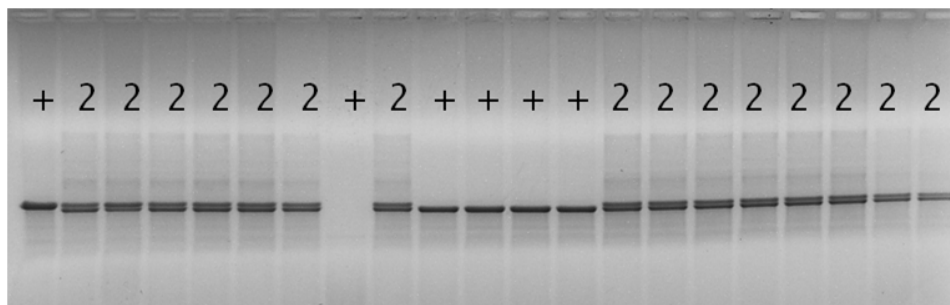


그림 4. 다양한 유전자원에 대해 L_2 -CAPS 마커 분석 결과. (+, L^+L^+ ; 2, L^2L^2)

따라서, 이 세 가지 L^+ 대립유전자(L^+ -27, L^+ -46 및 L^+ -82)와 L^2 대립유전자를 구분할 수 있는 공우성 분자표지를 개발하기 위해 각각을 다양한 프라이머를 이용하여 염기서열 분

석을 수행하였다. 그 결과, 아래 그림과 같이 두 개의 공우성 분자표지(L^+ -82-SCAR와 L^+ -27,46-CAPS)를 개발할 수 있었다(그림5와 6).

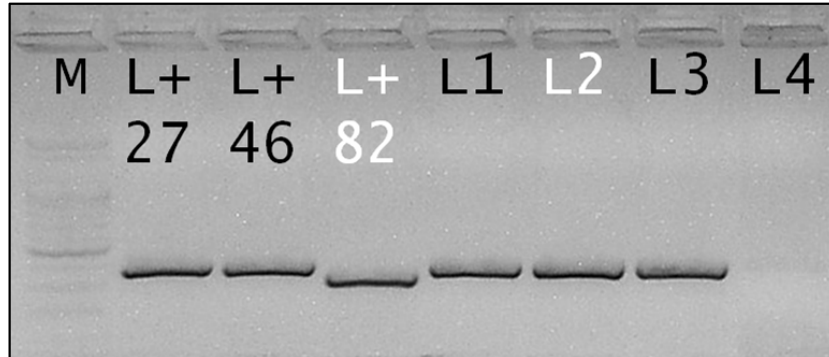


그림 5. L^+ -82-SCAR 마커 분석 결과.

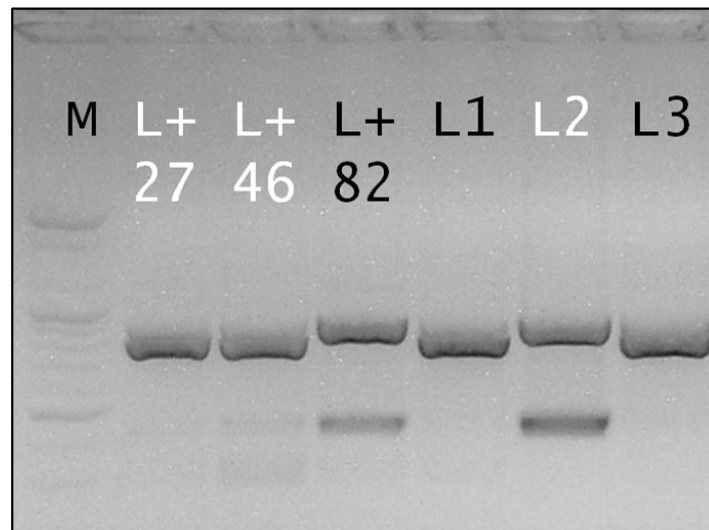


그림 6. L^+ -27,46-CAPS 마커 분석 결과.

많은 염기서열 분석을 수행하였지만 완전히 L^2 대립유전자에만 특이적인 염기서열은 찾을 수 없었다. 하지만 위의 두 개의 마커와 같이 L^+ 대립유전자와 L^2 대립유전자를 구분할 수 있는 공우성 분자표지를 개발할 수 있었다.

다. L 유전자 분리집단에서 개발된 분자표지의 적용성 검증

TMV 저항성 대립유전자(L^1 , L^2 , L^3 및 L^4)를 구별할 수 있는 특이 분자마커를 이용해 시중에 판매되고 있는 상용고추 53종의 L 유전형을 조사하였다(표 3). 5개 품종(CF-4, CF-28, CF-38, CF-40, CF-41)을 제외하고 표현형과 마커의 유전형이 정확히 일치하였다. CF-4와 CF-28의 경우 생물검정에 의한 결과 보다 마커 유전형이 더 정확했고, CF-38, CF-40, CF-41 경우는 표현형 결과가 보다 정확하였다. CF-38, CF-40, CF-41는

사용한 L 연관 마커와 실제 L 유전자좌 간에 재조합으로 판단되었고 개발한 L 연관 마커는 향후 고추의 TMV 저항성 고추품종 육성에 매우 유용할 것으로 판단되었다(표 3).

표 3. 생물검정과 TMV 저항성 대립유전자(L^1 , L^2 , L^3 및 L^4) 연관 특이 분자마커를 이용한 상용고추 53종의 L 유전형 비교

PBI No.	회사명	TMV 접종	TMV 마커	PBI No.	회사명	TMV 접종	TMV 마커
CF-1	신젠타	L^2	21	CF-28	몬산토(홍농)	L^2 (불안정)	++
CF-2	신젠타	L^2	21	CF-29	몬산토(홍농)	L^2	22 or 2+
CF-3	신젠타	L^2	22	CF-30	농협	L^2	22 or 2+
CF-4	신젠타	L^2	1+	CF-31	농협	L^2	22 or 2+
CF-5	신젠타	L^2	22 or 2+	CF-32	농협	L^2	22
CF-6	농우	L^2	22	CF-33	동부하이텍	L^2	22 or 2+
CF-7	농우	L^4	42	CF-34	동부하이텍	L^2	22 or 2+
CF-8	농우	L^4	42	CF-35	동부하이텍	L^2	22 or 2+
CF-9	농우	L^2	22	CF-36	동부하이텍	L^2	22 or 2+
CF-10	농우	L^4	4+	CF-37	사까다	L^2	22 or 2+
CF-11	농우	L^4	42 or 4+	CF-38	사까다	L^2	32
CF-12	농우	L^4	4+	CF-39	사까다	L^3	3+
CF-13	농우	L^2	42 or 4+	CF-40	코레곤	L^3 or L^4	22 or 2+
CF-14	농우	L^4	4+	CF-41	코레곤	L^3 or L^4	22 or 2+
CF-15	농우	L^2	22 or 2+	CF-42	코레곤	L^2	22 or 2+
CF-16	농우	L^4	4+	CF-43	코레곤	L^2	22 or 2+
CF-17	농우	L^4	42 or 4+	CF-44	코레곤	L^2	22 or 2+
CF-18	농우	L^2	22 or 2+	CF-45	다끼이	L^3	33
CF-19	몬산토(홍농)	L^3	32	CF-46	대농	L^2	22 or 2+
CF-20	몬산토(홍농)	L^2	22 or 2+	CF-47	대농	L^2	22 or 2+
CF-21	몬산토(홍농)	L^2	22	CF-48	대농	L^2	22 or 2+
CF-22	몬산토(홍농)	L^2	22	CF-49	아시아종묘	L^2	22 or 2+
CF-23	몬산토(홍농)	L^2	2+	CF-50	아시아종묘	L^2	22 or 2+
CF-24	몬산토(홍농)	L^2	22 or 2+	CF-51	아시아종묘	L^2	22 or 2+
CF-25	몬산토(홍농)	L^2	22 or 2+	CF-52	아시아종묘	L^2	22 or 2+
CF-26	몬산토(홍농)	L^2	2+	CF-53	아시아종묘	L^2	22 or 2+
CF-27	몬산토(홍농)	L^2	2+				

3. 고추 분자표지 multiplexing 기술 개발

가. multiplexing용 분자표지 개발

(1) 본 연구에서 정의한 multiplexing이란 두 개 이상의 마커를 한 번의 PCR 반응을 통해 분석하는 방법을 말하며, 본 기술은 마커분석서비스에 있어서 재료비 절감에 큰 공헌을 할 수 있을 것이라고 생각한다. 현재 수십 개의 마커를 한 번에 분석할 수 있는 방법들이 여러 가지가 있지만, 이러한 방법들은 마커 1개당 분석 비용은 절감될 수 있으나 한 번에 수십 개의 마커를 분석해야 하기 때문에 분석 개체 당 분석비용은 증가하게 돼 실제 분석서비스에 적용하기에는 한계가 있다. 현재 실제 육종가들이 원하는 수준은 개체 당 수 개(2-5개) 내외의 마커를 한 번에 분석하는 것이기 때문에 multiplexing 기술을 이용하고자 하였다.

본 과제에서 고추 마커 분석지원서비스를 수행하는데 수요가 많았던 마커를 중심으로 해 표 4와 같이 15조합에 대해 multiplex 용 마커 개발을 수행하고자 하였다(표4).

표 4. Multiplex 용 마커 개발 조합.

특성	마커	OPP	<i>msk</i>	M3	Anth12	Anth9
<i>Rf</i>	PR	-	-	개발완료	-	-
	OPP	-	-	-	-	-
GMS	<i>msk</i>	-	-	-	-	-
역병	M3	-	-	-	-	-
탄저병	Anth12	-	-	-	-	-
	Anth9	-	-	-	-	-

조사한 15개 조합 가운데 14개 조합에서는 마커별 특이 산물을 명확하게 구분하기 힘들었 으며(그림 7), PR-CAPS와 M3-CAPS 조합만이 multiplex용으로 적합하였다(그림 8).

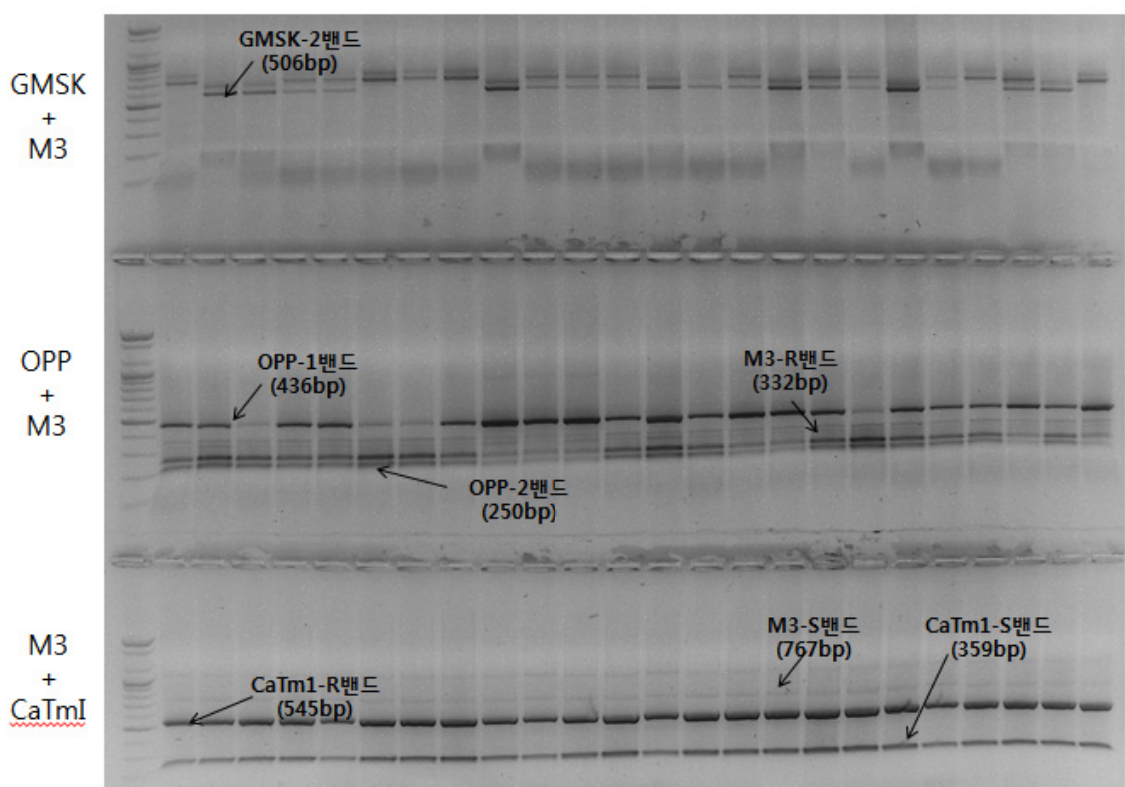


그림 7. multiplex 용 마커 개발. Gmsk + M3(응성불임 + 역병 저항성), OPP +M3(응성불임회복+ 역병 저항성), M3+CaTm1(역병 저항성 + CMV-P0 저항성).

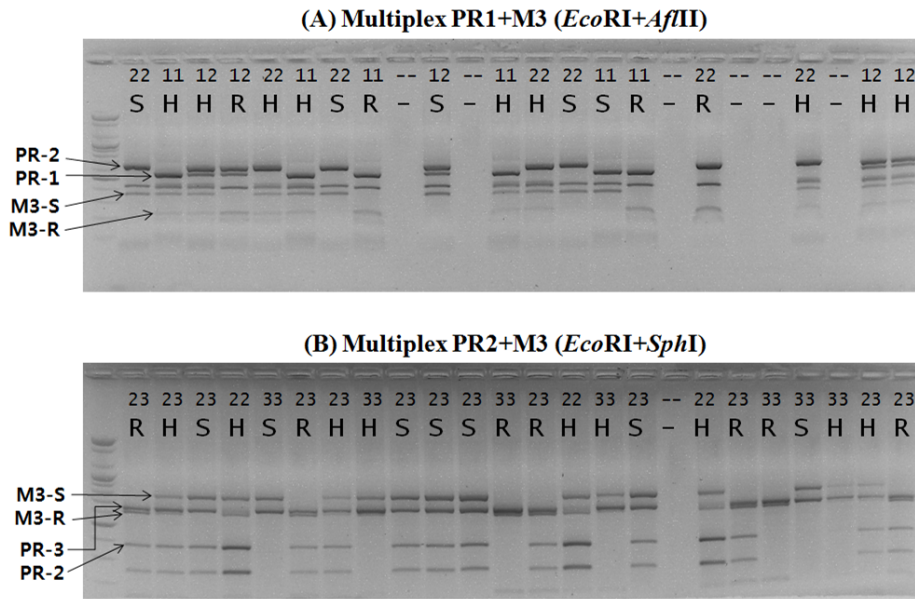


그림 8. PR-CAPS(*Rf* 마커)와 M3-CAPS(역병 저항성 마커)의 multiplex 용 마커 분석 결과. PR-CAPS 마커형(11, 12, 22, 23 및 33), M3-CAPS 마커형(R, H 및 S).

4. 기 개발된 고추 마커를 HRM 마커로 전환

가. *Rf*, 역병, *ms_k*, CMV 저항성용 HRM 마커 개발

Rf(PR-CAPS)마커와 역병(M3-CAPS)마커를 한 번의 PCR을 통해 동시에 분석할 수 있는 방법을 개발한 바 있다. 하지만 multiplexing 기술 개발이 생각보다 쉽지 않았다. 우선 두 개의 특이 단편을 증폭하기 위한 (제한효소를 처리하였을 때, 각 단편의 크기를 고려하면서) 프라이머를 디자인하기가 쉽지 않았고, 각 단편 특이적인 제한효소를 선발하는 것에 제한이 많았다. 따라서 multiplexing 기술보다 방법이 훨씬 간단하고 분석시간도 짧은 SNP(HRM) 마커 개발로 목표를 수정하였다. HRM(high resolution melting) 분석 방법은 기존의 CAPS 방법에서 꼭 거쳐야 하는 단계인 제한효소 처리(2시간)와 전기영동(1시간)을 수행하지 않아도 된다는 장점이 있다. 즉 PCR 단계(1시간)와 melting curve를 그리는 단계(30분)만으로 결과를 얻을 수 있다. 4차년도에는 *Rf*, 역병, *ms_k*, CMV에 대한 STS 마커를 HRM 마커로 개발하였다(그림 9).

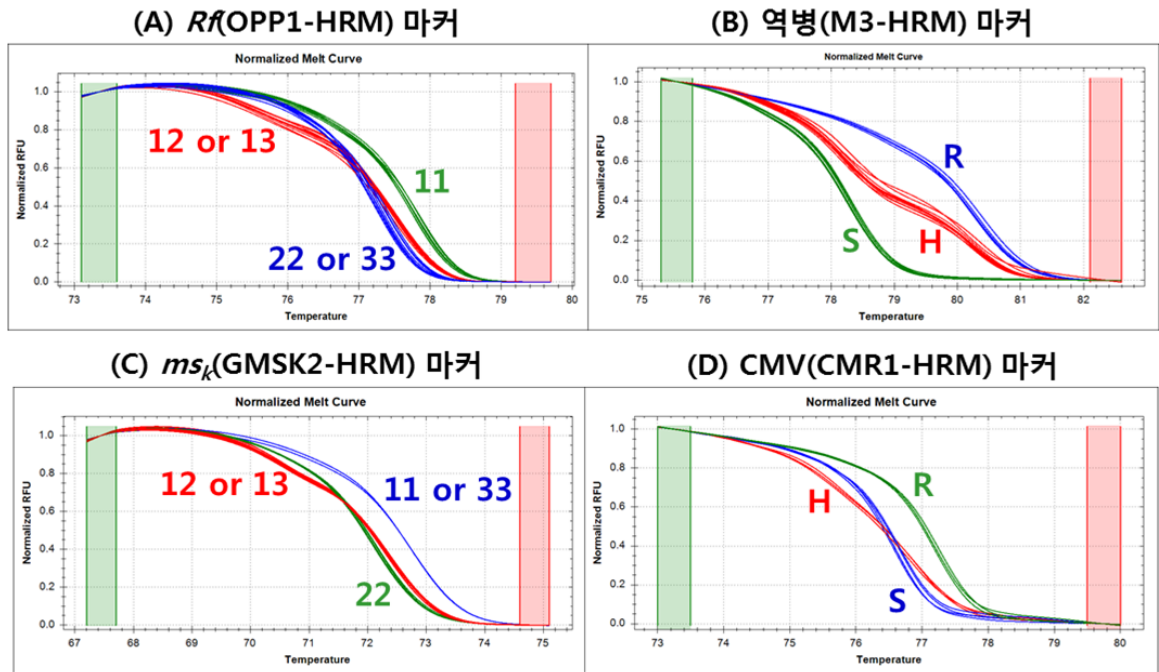


그림 9. Rf(A), 역병(B), ms_k (C) 및 CMV(D)에 대한 HRM 마커 melting curve 그래프. R, homozygous resistant (RR); H, heterozygous resistant (Rr); S, susceptible (rr).

나. HRM 분석 및 기존 STS 마커와 cosegregation 확인

Rf, 역병, ms_k 및 CMV용 HRM 마커와 STS 마커가 동일 재료에서 같이 분리되는지를 확인한 결과 모두 동일하게 분리되어 기존의 STS 마커가 HRM 마커로 성공적으로 전환됨을 확인하였다(표 5).

표 5. HRM 마커와 기존 STS 마커와 cosegregation 비교

Rf			ms_k			CMV(CmTm1)			역병(M3)		
Sample	STS 결과	HRM 결과	Sample	STS 결과	HRM 결과	Sample	STS 결과	HRM 결과	Sample	STS 결과	HRM 결과
C01	33	33	#11-382-73	12	H	#13-075-26	S	S	A01	S	S
C02	11	11	#11-382-74	12	H	#13-075-27	R	R	A02	S	S
C03	13	13	#11-382-75	11	S	#13-075-28	S	S	A03	R	R
C04	13	13	#11-382-76	11	S	#13-075-29	H	H	A04	S	S
C05	11	11	#11-382-77	11	S	#13-075-30	R	R	A05	R	R
C06	13	13	#11-382-78	11	S	#13-075-31	S	S	A06	S	S
C07	33	33	#11-382-79	22	F	#13-075-32	S	S	A07	R	R
C08	33	PCR X	#11-382-80	22	F	#13-075-33	S	S	A08	R	R
C09	11	11	#11-382-81	12	H	#13-075-34	R	R	A09	R	R
C10	11	11	#11-382-82	12	H	#13-075-35	R	R	A10	S	S
C11	12	12	#11-382-83	22	F	#13-075-36	R	R	A11	S	S
C12	12	12	#11-382-84	12	H	#13-075-37	S	S	A12	S	S
C13	12	12	#11-382-85	22	F	#13-075-38	R	R	A13	S	S
C14	11	11	#11-382-86	12	H	#13-075-39	R	R	A14	S	S
C15	22	22	#11-382-87	12	H	#13-075-40	S	S	A15	S	S
C16	22	22	#11-382-88	12	H	#13-075-41	H	H	A16	H	H
C17	22	22	#11-385-21	11	S	#13-075-42	H	H	A17	H	H
C18	12	12	#11-385-22	11	S	#13-075-43	R	R	A18	H	H
C19	11	11	#11-385-23	13	H	#13-075-44	R	R	A19	H	H
C20	12	12	#11-385-24	22	F	#13-075-45	R	R	A20	S	S
C21	12	12	#11-385-25	22	F	#13-075-46	R	R	A21	H	H
C22	11	12	#11-385-26	22	F	#13-075-47	S	S	A22	S	S
C23	22	PCR X	#11-385-27	11	S	#13-075-48	S	S	A23	H	H
C24	11	12	#11-385-28	37	F	#13-075-49	H	H	A24	R	R

5. 고추 매운맛 함량 조절유전자 연관 마커 개발

가. 고추 매운맛 함량을 낮추는 유전자와 연관된 마커 개발

(1) 유전분석 및 마커개발용 집단 육성

신미 함량과 관련된 다양한 소재를 탐색하던 중 신미 함량을 낮추는 계통(135BG)을 찾게 되었다. 이 계통을 신미 함량이 다양한 계통에 교배하게 되면, F₁ 식물체의 고추에서 신미 함량이 전체적으로 낮아졌다(그림 10). 따라서 135BG 계통에 신미 함량을 낮추는 유전자가 있을 것으로 추정하였고, F₂ 분리집단을 지난 3년간 3번 재배하여 신미 함량을 조사한 결과, 신미 함량을 낮추는 유전자가 단일 우성으로 작용한다는 것을 유전분석을 통하여 확인하였다.

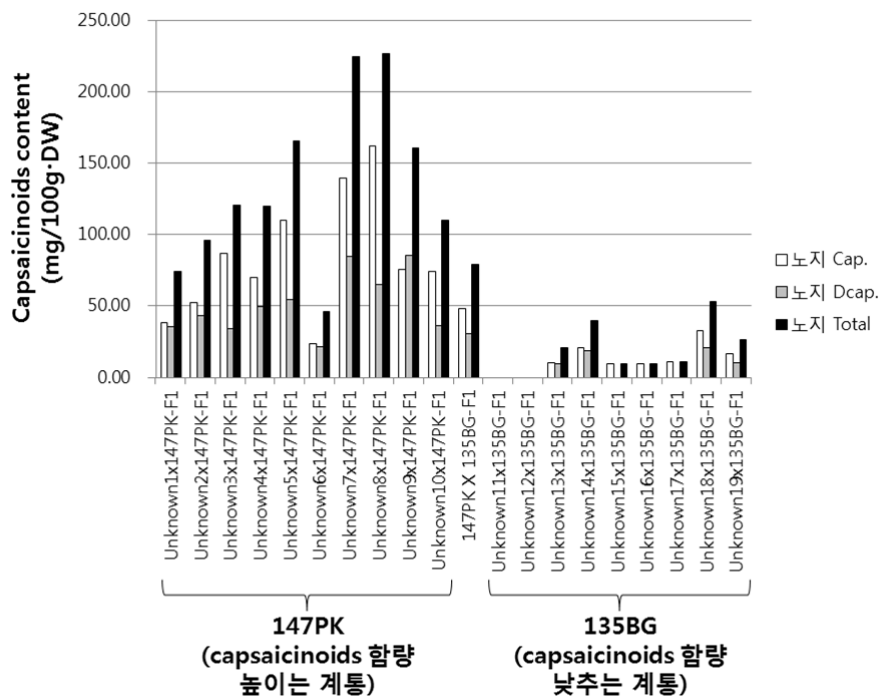


그림 10. 신미(capsaicinoids) 함량을 높이는 계통(147PK)과 낮추는 계통(135BG)을 다양한 계통에 교배하여 얻은 F₁ 식물체에서 신미 함량 분석 결과. Cap., capsaicin; Dcap., dihydrocapsaicin.

여러 F₁ 조합을 작성했을 때, 특정 고추 계통(DB 부계)이 교배되었을 때 F₁에서 매운맛 함량이 전체적으로 낮아지는 현상을 보였는데 매운맛을 낮추는 유전자가 있을 것으로 생각하였다. 이러한 현상이 유전적인 요인에 의한 것인지를 확인하고, 유전적인 요인이면 매운맛 함량을 낮추는 유전자와 연관된 분자표지를 개발하려고 하였다. 이러한 현상은 매운맛을 완전히 없게 만드는 *pun1* 유전자에 의한 것은 아니었다.

유전분석을 위해 이 계통(DB 부계)을 이용하여 두 개의 F₂ 및 BC 집단을 만들었고, 2009년 4월부터 10월까지 포장에 정식하여 매운맛 함량을 분석하였다(표 6). DB 부계를 매운맛을 가진 태국 계통과 DB 모계에 교배한 F₁에서 모두 매운맛이 낮아졌다(표 6).

따라서 매운맛을 낮추는 유전자는 우성으로 작용할 것으로 생각되었다. 그리고 F₂ 및 BC 분리세대에서 매운맛 함량을 조사하였다(그림 11 및 12). DB 부계와 태국 계통 조합의 F₂ 및 BC 분리세대에서 매운맛 함량 분리를 보면, 매운맛을 낮추는 우성 주동유전자가 있을 것을 생각된다(그림 11). 하지만 DB 부계와 DB 모계 조합의 결과를 보면, F₂에서는 매운맛 함량이 낮은 것으로 고정된 것처럼 나타나지만, BC세대에서는 매운맛이 높은 것과 낮은 것이 분리가 되는데, 아마도 DB 모계가 고정되지 못했기 때문에 이런 결과가 나온 것으로 추정된다(그림 12와 표 6). 따라서 DB 부계와 태국계통 조합의 분리집단을 이용하여 분자표지를 개발하고자 한다.

표 6. 매운맛 함량은 낮추는 계통인 DB 부계를 이용한 두 조합의 F₂ 및 BC 분리집단 작성.

No.	세대	교배 조합	정식주수	표현형
603-4	P2	태국	10	매운맛
603-6	P3	DB ♀	10	분리
603-7	P4	DB ♂	10	안매운맛
603-1	F ₁	DB ♂ X 태국	10	매운맛 낮추었음
603-3	F ₁	DB ♂ X DB ♀	10	안매운맛(1개 매운맛)
603-8	F ₂	(DB ♂ X 태국)⊗	144	분리
603-9	F ₂	(DB ♂ X DB ♀)⊗	144	안매운맛(1개 매운맛)
603-12	BC ₁ P2	(DB ♂ X 태국) X 태국	40	분리
603-13	BC ₁ P3	(DB ♂ X DB ♀) X DB ♀	40	분리
603-10	BC ₁ P4	DB ♂ X (DB ♂ X 태국)	20	안매운맛
603-11	BC ₁ P4	DB ♂ X (DB ♂ X DB ♀)	20	분리

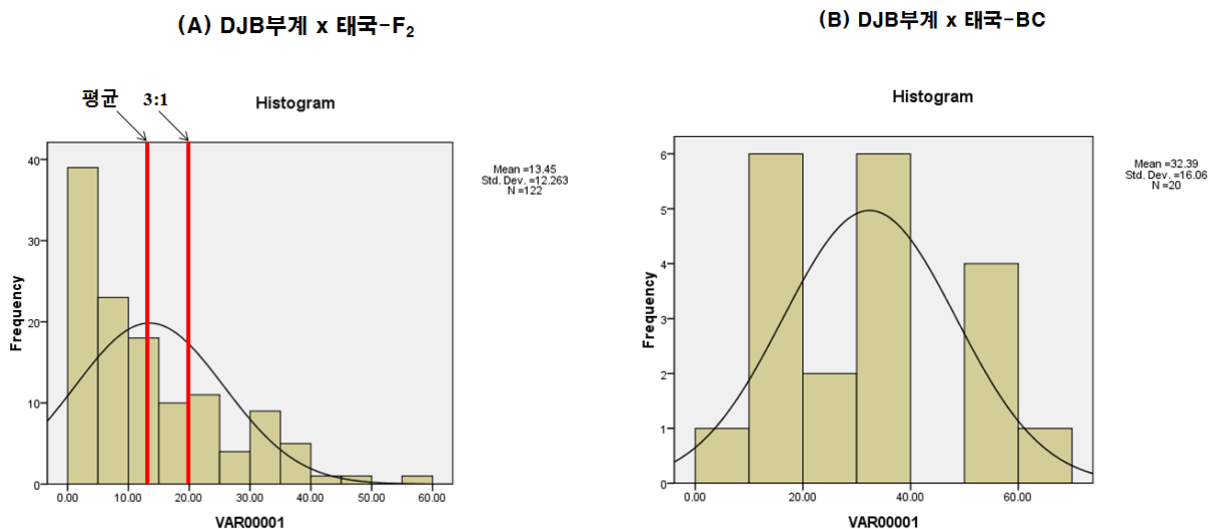


그림 11. DB 부계와 태국 계통 조합의 F₂(A) 및 BC(B) 분리집단에서 매운맛 함량 분포도.

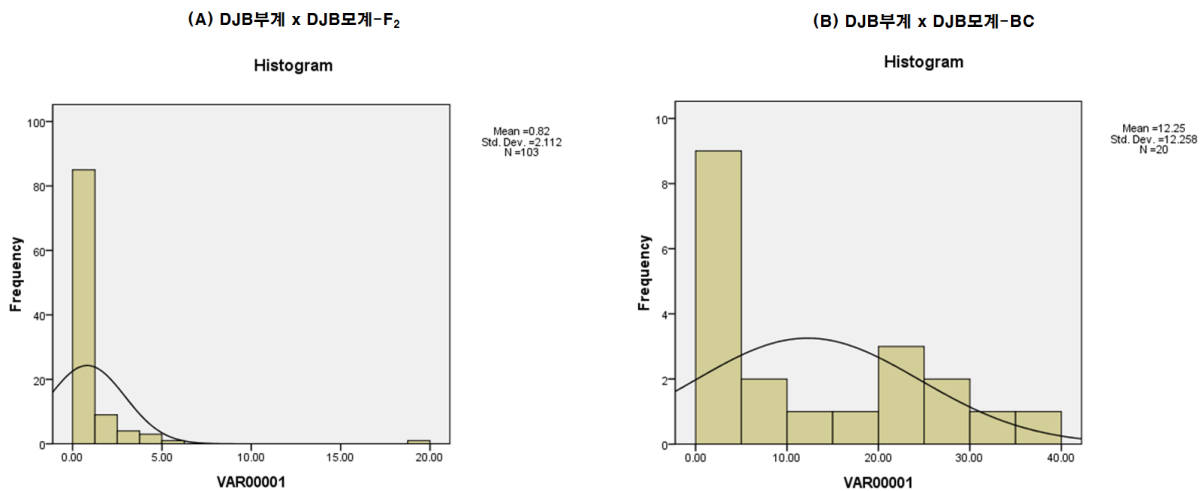


그림 12. DB 부계와 DB 모계 조합의 F₂(A) 및 BC(B) 분리집단에서 매운맛 함량 분포도.

1차년도 기초 실험을 통하여 매운맛 함량을 낮추는 유전자가 우성이며 단인자인 것으로 생각되어 마커 개발에 이용할 수 있도록 분리집단의 크기를 키워 재배하였다(표 7).

표 7. 고추에서 매운맛 함량을 낮추는 유전자와 연관된 마커를 개발하기 위한 집단 육성.

PBI No.	Generation	Cross combination	Symbol	개체수
801-1	P ₁	LP1 계통		8
801-2	P ₂	태국 계통		11
801-3	F ₁	LP1 X 태국		10
801-4	F ₂	(LP1 X 태국) - ⊗		142
801-5	BC ₁ P ₂	(LP1 X 태국) X 태국	(P ₁ X P ₂) X P ₂	70
801-6	BC ₁ P ₁	(LP1 X 태국) X LP1	(P ₁ X P ₂) X P ₁	72

전체적으로 교잡한 F₁에서 매운맛이 현저히 낮아진 것으로 보아 매운맛이 낮아지는 특성이 우성일 것으로 생각되었다(그림 13). 자가수정한 F₂ 분리집단에서는 매운맛이 낮은 것과 높은 것의 분리비가 거의 3:1이었고(그림 13A), 태국재래로 여교잡한 분리집단에서는 거의 1:1의 분리비를 보였으며(그림 13B), LP 계통으로 여교잡한 분리집단에서는 모두 매운맛이 낮은 쪽으로 치우쳐져 있었다(그림 13C). 이는 매운맛을 낮추는 하나의 주동 우성유전자가 있음을 보여주는 것이다.

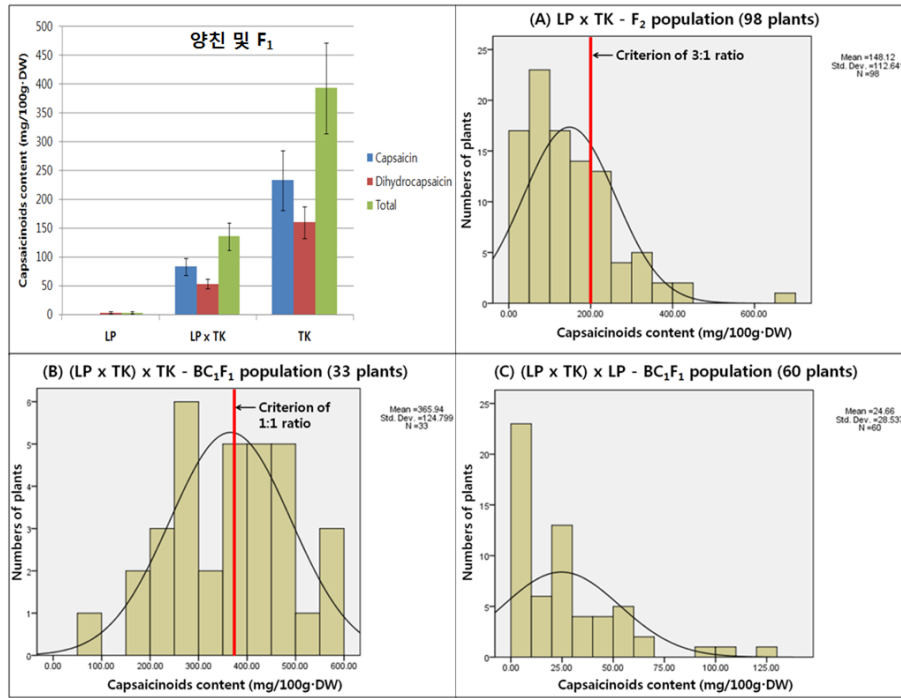


그림 13. 매운맛 함량을 낮추는 유전자 연관 분자표지 개발용 분리집단 매운맛 함량 분포도.

(2) 마커개발 적용 집단 육성

유전분석 및 마커개발 집단 외에도 마커 개발 및 적용 집단으로 이용하기 위하여 새로운 분리집단을 육성하였다. LP2가 매운맛 함량이 약 37mg/100g·DW 정도로 매운맛 함량을 낮추는 계통이고, 135T는 매운맛 함량이 약 92mg/100g·DW 정도로 매운맛이 높은 계통이다(그림 14). 두 계통 모두 *pun1*-SCAR 마커 분석을 통하여 정상적인 *Pun1* 유전자가 존재하고 있음을 확인하였다. 9개의 F₁ 개체에서 모두 매운맛 함량이 20mg/100g·DW에서 35mg/100g·DW 사이에 나타났고, 평균은 약 30mg/100g·DW이었다(그림14). 따라서 매운맛 함량이 양친의 중간 정도가 나타나지 않고 매운맛이 낮은 친 쪽으로 치우쳐져 나타났기 때문에 매운맛을 낮추는 유전자가 우성임을 다시 한 번 확인하였고, 이들 각 개체별로 F₂ 종자를 수확하였다.

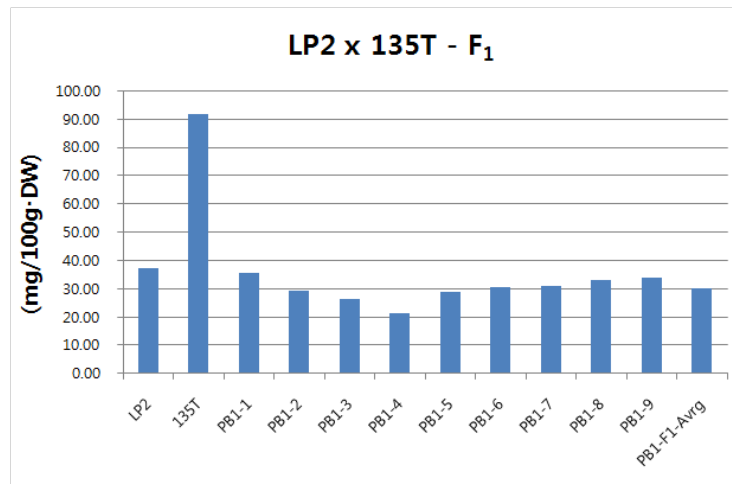


그림 14. 매운맛을 낮추는 LP2 계통과 매운맛 계통인 135T를 교배한 F₁에서 매운맛 함량의 분포.

(3) LP 연관 마커개발

(가) BSA-AFLP

이 유전자와 연관된 분자표지를 개발하기 위하여 BSA-AFLP 방법을 사용하여 256조합의 프라이머(E-ANN/M-GNN)를 1차 스크리닝하였다. 그 결과, 매운맛을 낮추는 유전자와 연관되었을 것으로 추정되는 4개의 프라이머 조합(E-AAC/M-GCG, E-AGG/M-GCA, E-AGG/M-GCT 및 E-ACT/M-GCA)을 선발할 수 있었다(그림 15).

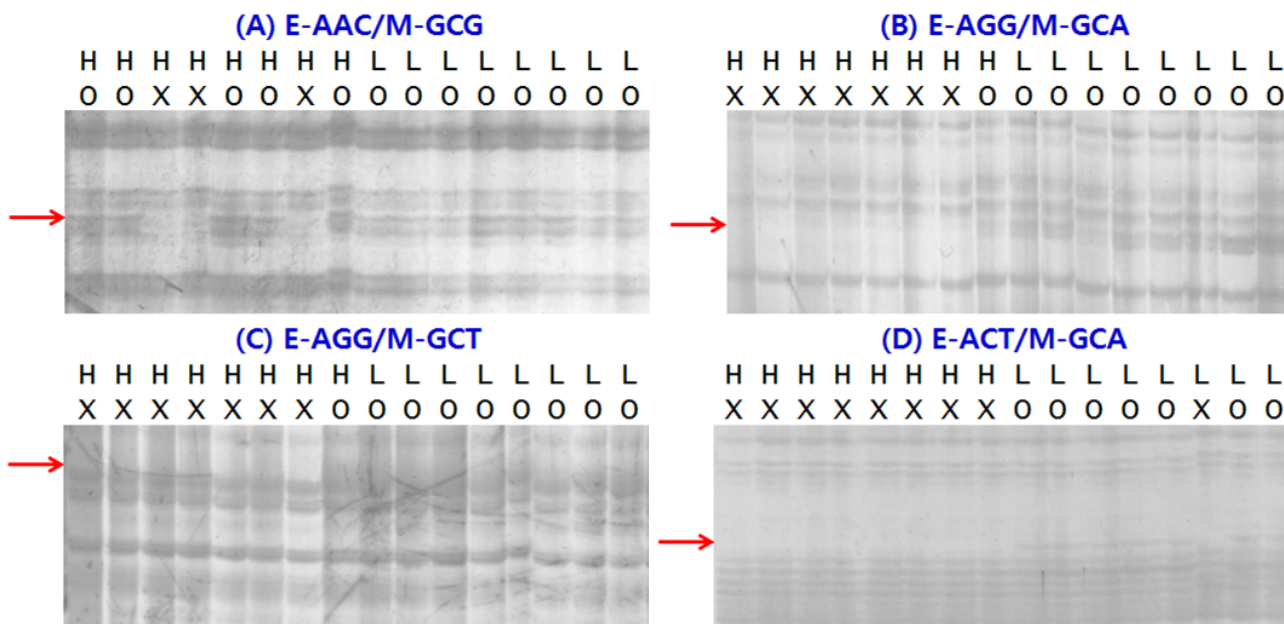


그림 15. 256개 AFLP 프라이머 조합(E-ANN/M-GNN) 분석(1차)에서 탐색된 4개의 AFLP 분자표지.

또한 육종에 쉽게 적용할 수 있는 STS 또는 SNP 분자표지로 전환하는 실험을 추가적으로 수행하였는데, 우선 AFLP 단편을 염기서열 분석하였다. 그 결과, E-AAC/M-GCG 조합의 다형성 단편 염기서열은 retrotransposon 염기서열로 PCR walking이 불가능하였고(그림 16A), E-AGG/M-GCA는 염기서열을 얻지 못하였다(그림 16B). E-AGG/M-GCT 경우에는 단편 염기서열은 얻었으나, 서울대 pepper genome database(<http://pgd.pepper.snu.ac.kr>)에서 blast search를 통해 주변 염기서열을 얻는데 실패하여 PCR walking을 수행하였다(그림 16C). 마지막으로 E-ACT/M-GCA는 AFLP 단편의 염기서열을 얻었고, 서울대 pepper genome database에서 blast search를 통해 flanking region 염기서열을 확보할 수 있었고, 이를 이용하여 CAPS 분자표지로 개발하였다(그림 16D). 하지만 마커형(markertype)과 표현형의 연관성이 전혀 없었다. 따라서 256개의 AFLP 프라이머 조합(E-ANN/M-CNN)을 추가적으로 스크리닝(2차)하였다. 그 결과, 매운맛을 낮추는 유전자와 연관되었을 것으로 추정되는 4개의 프라이머 조합(E-AAA/M-CAG, E-AAA/M-CGA, E-AAA/M-CGG 및 E-AAG/M-CAC)을 선발할 수 있었다(그림 16). 현재 선발된 AFLP 분자표지를 STS 또는 SNP 분자표지로 개발하는 연구를 수행하였다.

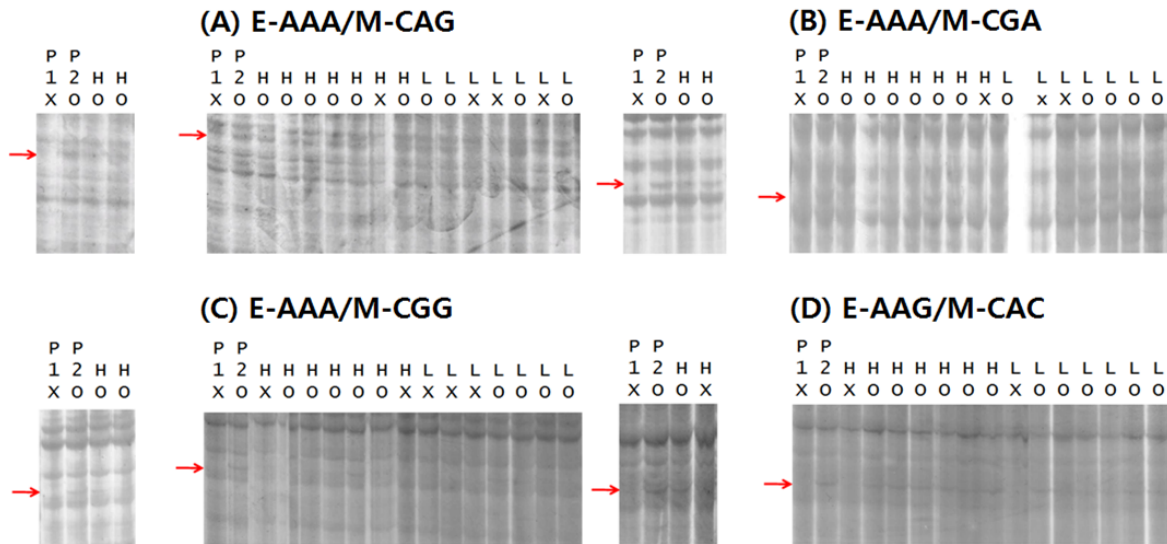


그림 16. 256개 AFLP 프라이머 조합(E-ANN/M-CNN) 분석(2차)에서 탐색된 4개의 AFLP 분자표지.

(나) AFLP 후보마커의 STS 또는 SNP(HRM) 분자표지로 전환

매운맛을 낮추는 유전자와 연관되었을 것으로 추정되는 8개의 프라이머 조합(E104M315, E111M313, E111M314, E114M313, E116M315, E101M403, E101M409 및 E112M406)을 선발할 수 있었다(표 8). 따라서 4차년도에는 육종에 쉽게 적용할 수 있는 STS 또는 SNP(HRM) 분자표지로 전환하는 실험을 수행하였다. 그 결과, E104M315 조합의 다형성 단편 염기서열은 retrotransposon 염기서열로 PCR walking이 불가능하였고, E111M313은 염기서열을 얻지 못하였다(표 8). 그리고 E101M403는 AFLP 단편 염기서열은 얻었으나, pepper genome database에 염기서열이 없었다. E111M314, E116M315 및 E112M406는 AFLP 단편의 염기서열을 얻었고, 서울대 pepper genome database에서 blast search를 통해 flanking region 염기서열을 확보할 수 있어 이의 염기서열을 양친간 비교하였는데 다형성이 없었다(표 8).

표 8. 탐색된 8개의 AFLP를 STS 또는 HRM 마커로 개발한 결과.

AFLP marker	135BG x 135T - F ₂ population														Fragment sequencing	Pepper contig blast	STS marker development	Linkage	
	H	H	H	H	H	H	H	H	L	L	L	L	L	L					L
E104M315	O	O	X	X	O	O	X	O	O	O	O	O	O	O	O	Success	Retrotransposon	Failed	-
E111M313	X	X	X	X	X	X	X	O	O	O	O	O	O	O	O	Failed	-	-	-
E111M314	X	X	X	X	X	X	X	O	O	O	O	O	O	O	O	Success	contig075966	Monomorphic	-
E114M313	X	X	X	X	X	X	X	O	O	O	O	O	X	O	O	Success	contig094620	94620-HRM	No
E116M315	O	O	O	O	O	O	O	X	X	X	X	X	X	X	X	Success	contig608465	Monomorphic	-
E101M403	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	O	X	O	O	Success	None	-	-
E101M409	O	O	O	O	O	O	O	O	X	O	X	X	X	O	O	Success	contig167908	167908-2-CAPS	Weak
E112M406	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	O	O	O	Success	contig333302	Monimorphic	-

그리고 E114M313은 AFLP 단편의 염기서열을 얻었고, 서울대 pepper genome database 에서 blast search를 통해 flanking region 염기서열을 확보할 수 있었고, 이를 이용하여 94620-HRM 마커로 개발하였으나, 마커형(markertype)과 표현형의 연관성이 전혀 없었다(그림 17).

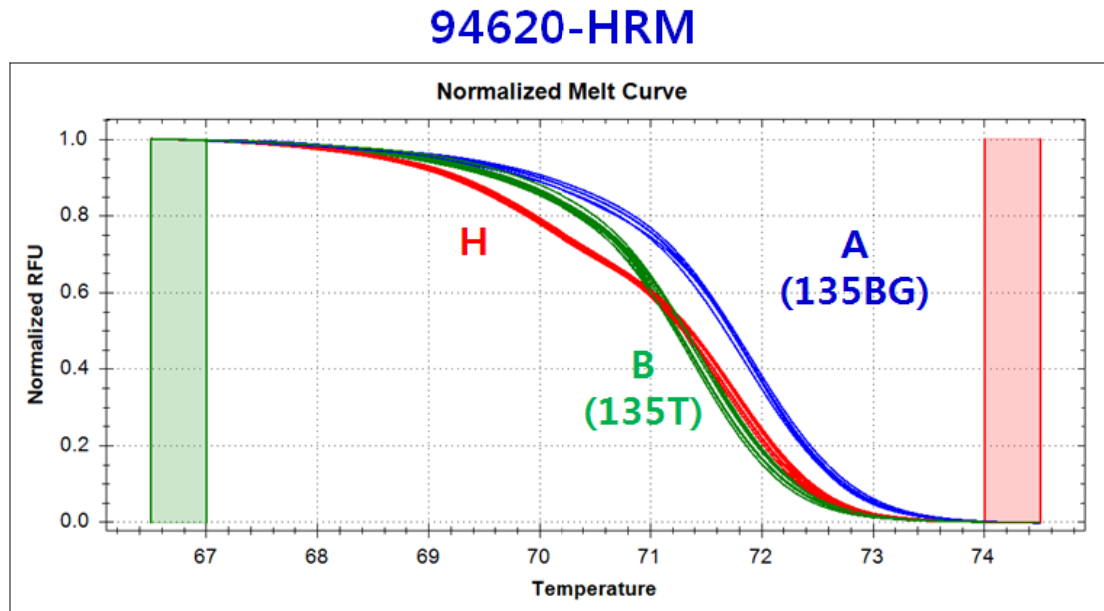


그림 17. AFLP 마커 E114M313 조합에서 개발된 94620-HRM 마커 결과. A, 135BG-type; B, 135T-type; H, heterozygous.

E101M409는 AFLP 단편 염기서열을 얻었고, pepper genome contig 염기서열 또한 얻어, 이를 이용하여 양친 간 염기서열을 분석하여 167908-2-CAPS 마커를 개발하였다(그림 18). 개발된 마커는 연관군 1번의 centromere쪽에 위치하였으나 표현형과는 다소 떨어져 연관된 것으로 확인되었다(그림 19).



그림 18. AFLP 마커 E101M409 조합에서 개발된 167908-2-CAPS 마커 결과. A, 135BG-type; B, 135T-type; H, heterozygous.

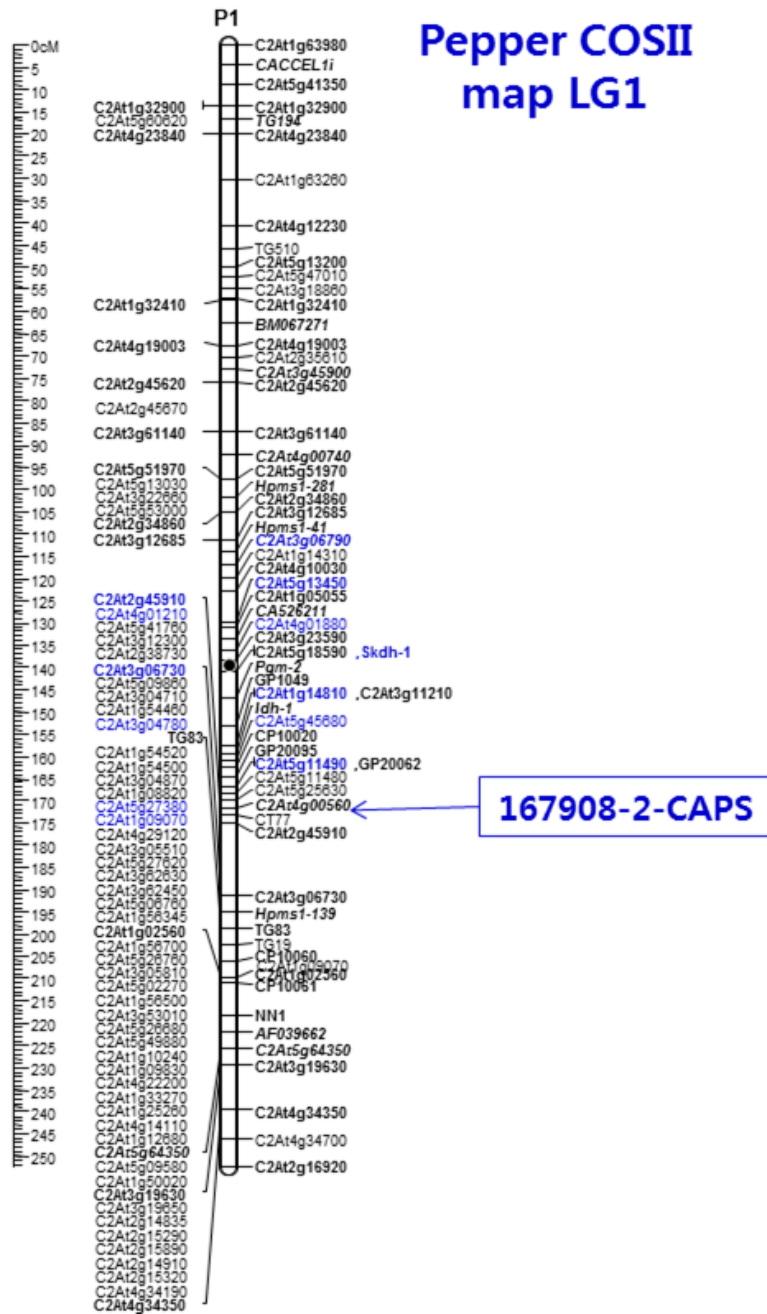


그림 19. COSII 마커로 그려진 고추 유전자지도 LG1에서 167908-2-CAPS 마커의 위치.

(다) QTL 분석을 이용한 LP유전자 연관 분자 표지 개발

4차년 실험에서 167908-2-CAPS 마커는 매운맛을 낮추는(LP) 표현형과 연관되어 있었으나, 밀접하게 연관되어 있지는 않았다. 매운맛 분석결과를 근거로 제작한 표현형 마커는 고추 염색체 상에서 실제 LP 유전자의 위치를 정확하게 추정하기에는 다소 부족한 부분이 있었다. 이는 매운맛이 0인 것과 0이 아닌 것을 기준으로 LP 표현형 마커를 추정하였기 때문에 매운맛이 낮은 상태에서 LP 유전자의 작용값이 클 경우 매운맛이 0인 것으로 잘 못 추정할 수 있는 가능성에 기인한다. 따라서 실제 LP 유전자가 전년도에 추정한 염색체 12번에 있는지, 그리고 표현형에 영향을 주는 다른 인자는 없는지를 확인하고자, 총 620개의 primer set(477개-PBI, 143개-원예연에서 분양 받음)를 이용해

mapping을 수행하였다. 이들 가운데 분석집단의 양친에서 다형성을 보인 것은 47개였는데 135T x 135BG 조합의 F₂ 분리집단에 적용한 결과 42개 마커를 mapping할 수 있었다. 2가지로 추정된 LP 표현형 마커를 포함해 Mapmaker과 CarthaGene로 연관분석(Lod3, Maimum distance 50cM)을 수행한 결과 총 14개 연관군이 생성되었고, WinQTLCart2.5 프로그램으로 QTL을 분석한 결과 LG12와 LG14에서 QTL의 존재를 확인할 수 있었다. 특히 LG14는 고추염색체 12번에 해당하는 것으로 Lod 값이 22이상으로 상당히 높게 나타났는데, 이는 연관군의 오른쪽 끝에 위치한 LP 표현형 마커로부터 기인하였다(그림 20).

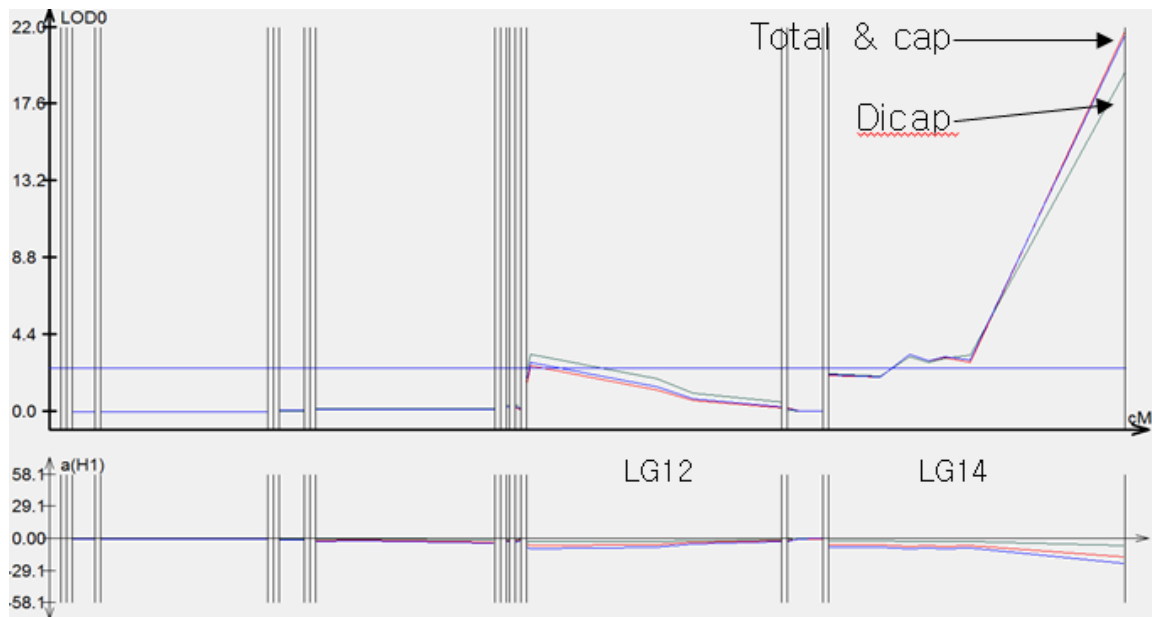


그림 20. 매운맛을 낮추는(LP) 표현형의 QTL을 분석한 결과. LG14의 오른쪽에 표현형 마커 포함하고 분석함. Total(capsaicin과 dihydrocapsicin 총량으로 분석), cap(capsaicin), Dicap(dihydrocapsicin).

이전의 유전분석 결과에서 매운맛을 강하게 낮추는 LP 유전자가 우성으로 존재한다는 것과 이를 근거로 정확한 표현형 마커를 추정하기 힘든 점을 고려할 때, 매운맛을 낮추는 현상은 한 개의 우성 유전자와 이와 가깝게 연관된 작용 값이 작은 다른 인자의 존재 가능성이 예상되었다. 비록 QTL 분석에 사용한 마커의 수가 적다고는 하나 전년의 결과처럼 매운맛을 낮추는 유전자는 염색체 12번 (LG14)에 분포하는 것으로 판단되었다. 정확하게 추정이 곤란하였던 LP 표현형 마커의 효과를 제거하여 QTL 분석의 정확도를 높이하고자 Lod4, Maximum distance 30cM에서 연관군 분석 및 QTL 분석을 수행하였다. 그 결과 LG14에서만 2개 QTL이 발견되어 매운맛을 낮추는 유전자는 염색체 12번에 존재하는 2개 유전자에 의해 조절되는 것으로 판단되었다. 이중 오른쪽에 위치한 L1210063-3 주변의 QTL은 pseudoQTL로 생각되는데, 이는 L1210063-3에서 오른쪽 바깥쪽으로 37.2 cM 떨어진 곳에 LP 표현형 마커에 의한 간섭현상에 기인한 것으로 판단되었다(그림 21).

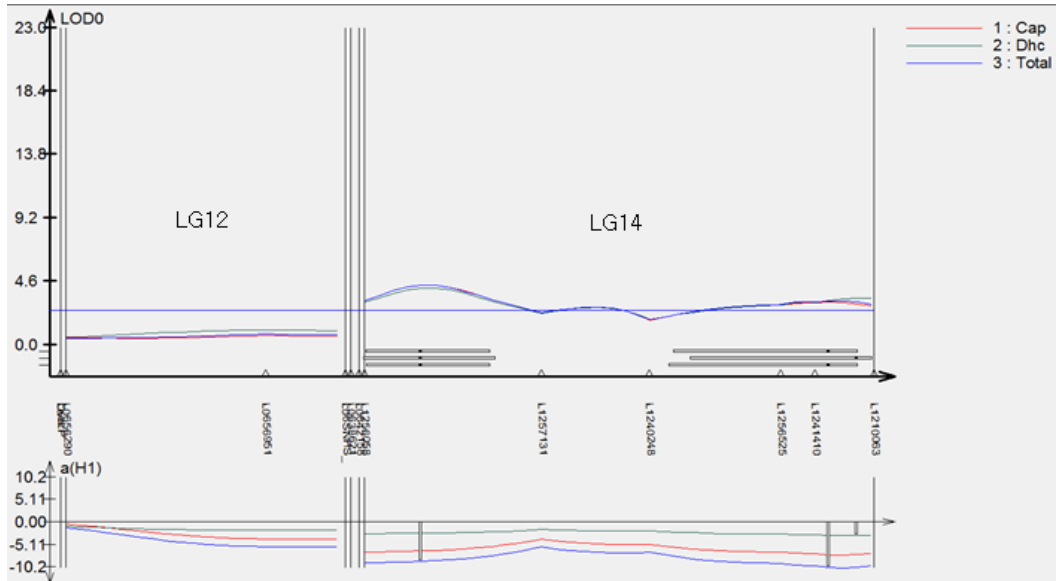


그림 21. 매운맛을 낮추는(LP) 표현형의 QTL을 분석한 결과. 그림 20의 LG14의 오른쪽에 위치한 표현형 마커 제거하고 분석함. Total(capsicin과 dihydrocapsicin 총량으로 분석), cap(capsicin), Dicap(dihydrocapsicin).

나. 고추 매운맛 함량을 높이는 유전자와 연관된 마커 개발

(1) 유전분석 및 집단 육성

앞의 내용과는 반대로 고추의 매운맛 함량을 높이는 유전자도 있는 것으로 생각되는데, 매운맛 계통인 135T는 위에서 사용한 것과 같은 계통이고, HP1은 *pun1*-SCAR 마커 분석을 통하여 정상적인 *Pun1* 유전자가 없는 계통으로 매운맛 함량이 아주 낮게 나타난다(그림 22). 하지만 이 두 계통을 교배한 F₁에서는 모두 매운맛 계통인 135T보다 높은 매운맛 함량을 보였다(그림 22). 이는 HP1이 잠재적으로 매운맛을 높게 만드는 유전자를 가지고 있다고 생각되고, 우성으로 작용할 것으로 예측되었다(그림 22).

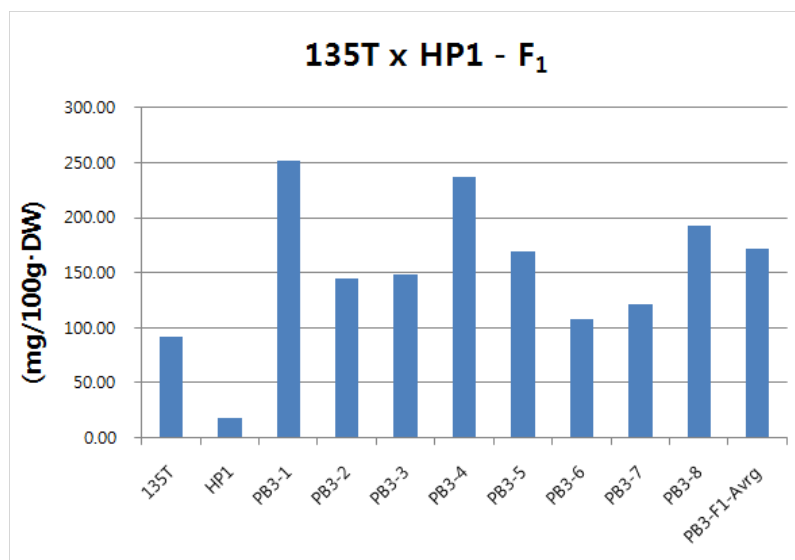


그림 22. 매운맛 계통인 135T와 매운맛 함량을 높이는 계통 HP1을 교배한 F₁에서 매운맛 함량의 분포.

매운맛 계통인 135T에 HP 계통을 교배했을 때 F₁의 매운맛이 양친보다 높아지는 현상에 대한 유전분석을 수행하기 위해 135Tx147PK 조합의 F₁ 및 F₂ 분리집단 125개 개체를 정식하였다(표 9).

표 9. 매운맛 함량을 높이는 유전자 연관 분자표지 개발용 분리집단.

PBI No.	세대	교배조합	개체수
집단3	F ₁	135T x 147PK(매운맛 함량 높이는 계통)	20
집단4	F ₂	135T x 147PK(매운맛 함량 높이는 계통)	125

그 중 F₁ 19개 및 F₂ 113개에 대해서 고추 과실을 얻어 매운맛 함량 분석을 수행한 결과(그림5와 6), 135K 계통은 매운맛 함량이 100mg/100g·DW 정도 되고, 147PK 계통(매운맛 함량 높이는 계통)은 *Pun1* 유전자가 없어 매운맛이 없는 계통이다. 이를 교배한 F₁에서는 150mg/100g·DW 이상의 매운맛 함량을 보이는 것도 있고, 높아지지 않은 것도 있는데, 이는 147PK 계통에서 매운맛 함량과 관계된 부분이 아직 덜 고정되었기 때문이라 생각되며, 전년도 결과와 유사하였다(그림 23).

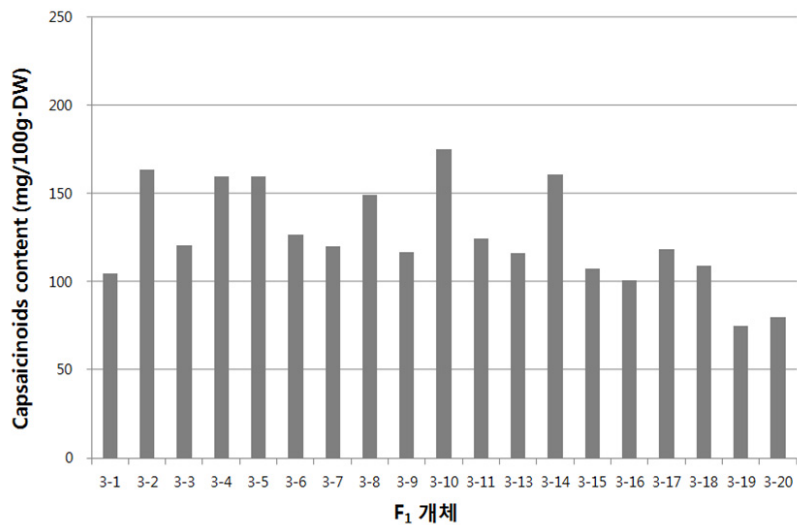


그림 23. 135T(매운 계통)과 147BG(매운맛 함량 높이는 계통)를 교배한 F₁에서 매운맛 함량.

전년에 매운맛 함량이 높았던 F₁(150mg/100g·DW 이상)을 자가수정하여 F₂ 분리집단을 육성하였다. F₂ 분리집단에서는 113개 개체에 대해 매운맛 함량을 분석하였고, *pun1*에 대해서도 마커 분석을 수행하였다. 우선 *pun1* 마커에 대해 N(non-pungent) 마커형으로 나타난 것(28개)을 제외한 나머지 85개 개체에 대해 매운맛 함량 분포도를 그려보았다(그림 24). 매운맛 함량 분포는 16mg/100g·DW에서 267mg/100g·DW까지 다양하게 분포하였는데, 그림6에서 보듯이 정규분포를 하는 것처럼 보인다(그림 24). 또한 정규분포 검정(significance가 0.05이상이면 정규분포, 0.05이하면 비정규분포)을 수행한 결과, 두 검

정 모두 0.05이상(0.200 및 0.143)으로 나타나 정규분포 하는 것으로 판단된다(표 10). 표현형이 정규분포 한다는 것은 이 표현형에 관련된 유전인자가 단일자가 아닌 다인자에 의한 것으로 양적형질 분석을 수행하여야 한다는 것을 의미한다.

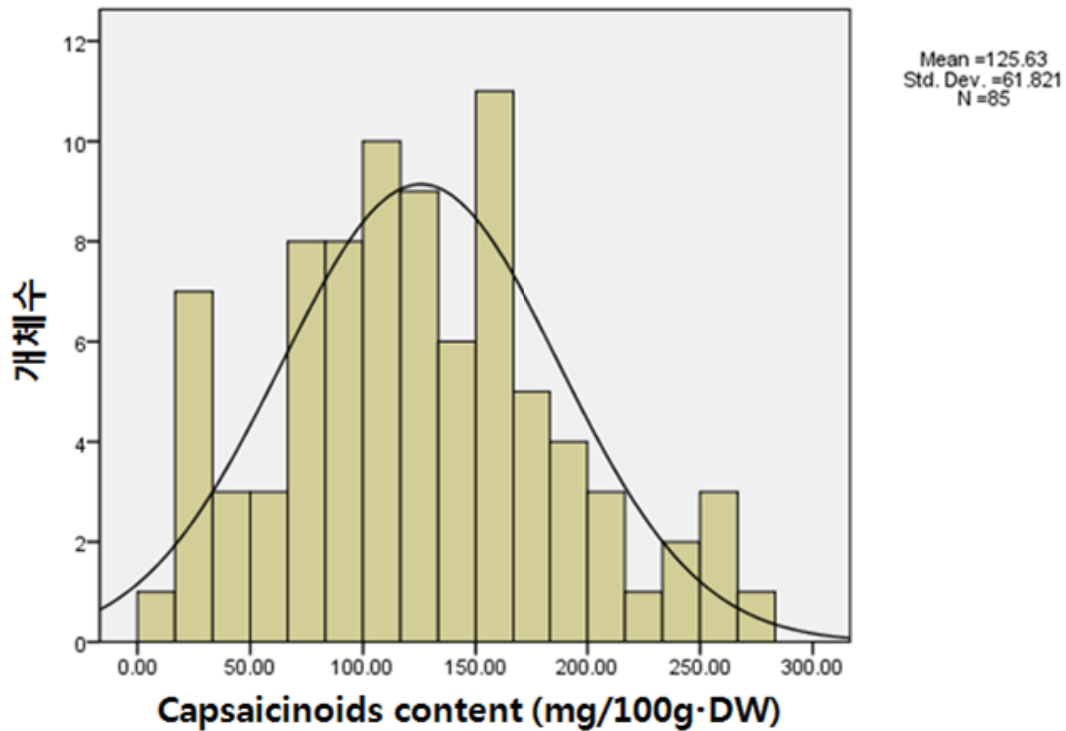


그림 24. 135T(매운 계통)과 147BG(매운맛 함량 높이는 계통)를 교배한 F₂에서 매운맛 함량 분포.

표 10. 135T(매운 계통)과 147BG(매운맛 함량 높이는 계통)를 교배한 F₂ 분리집단에서 매운맛 함량에 대한 정규분포 검정.

Trait	Tests of normality					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
매운맛 함량	.064	85	.200	.977	85	.143

또한 흥미로운 분석 결과의 하나는 *pun1* 마커로 N(non-pungent) 마커형으로 나타난 부분에서 매운맛이 나타나는 것이다. 기존 이론에 의하면 매운맛 유무는 *Pun1*과 *pun1* 대립유전자에 의해 결정되는 것으로 보고하였는데, 본 연구의 분석 결과에 의하면 *Pun1* 유전자 외에 capsaicin 합성에 관여하는 또 다른 유전자(*Pun2*로 명명)가 있는 것으로 생각된다(표 11).

표 11. 135T(매운 계통)과 147BG(매운맛 함량 높이는 계통)를 교배한 F₂ 분리집단에서 pun1 마커로 N(non-pungent)에 대한 매운맛 함량.

Sample No.	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	Total capsaicinoids(mg/100g)	pun1 마커
4-54	<1	<1	<1	N
4-56	<1	<1	<1	N
4-58	<1	<1	<1	N
4-113	<1	<1	<1	N
4-114	<1	<1	<1	N
4-116	<1	<1	<1	N
4-121	<1	<1	<1	N
4-122	<1	<1	<1	N
4-47	2.32	<1	2.32	N
4-91	3.96	<1	3.96	N
4-79	5.82	<1	5.82	N
4-67	8.79	<1	8.79	N
4-77	10.55	<1	10.55	N
4-10	13.21	<1	13.21	N
4-12	13.49	<1	13.49	N
4-74	15.85	<1	15.85	N
4-16	16.79	<1	16.79	N
4-102	19.85	<1	19.85	N
4-4	22.18	<1	22.18	N
4-34	33.24	<1	33.24	N
4-78	38.80	<1	38.80	N
4-3	39.39	<1	39.39	N
4-60	40.11	<1	40.11	N
4-22	63.72	<1	63.72	N
4-68	64.58	<1	64.58	N
4-96	72.45	<1	72.45	N
4-103	95.75	<1	95.75	N
4-98	<1	23.05	23.05	N

137T 신미 계통과 147PK 무신미 계통 유래 F₁ 식물체 20개체를 지난 3차년도에 정식하여 신미 함량을 분석한 결과, 신미 함량이 높았던(160mg/100g·DW 이상) 3-2, 3-4, 3-5, 3-10 및 3-14를 선발하여 자가수정 하였다(그림 25).

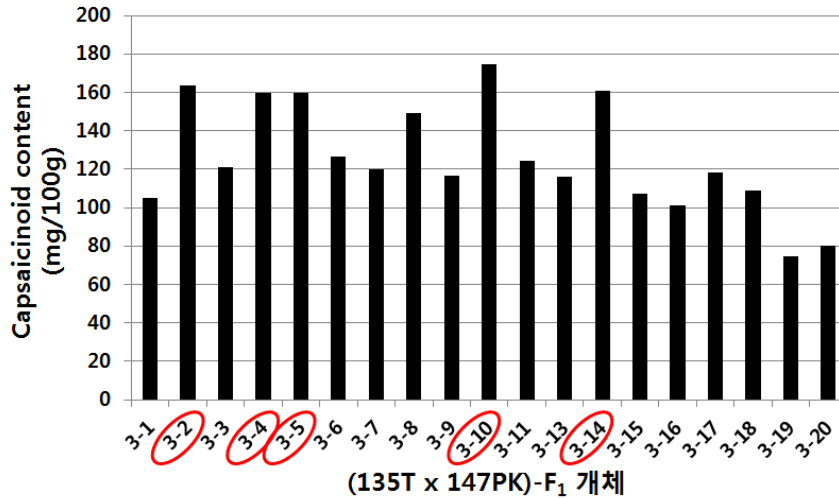


그림 25. 135T와 147BG를 교배한 F₁에서 capsaicinoids 함량.

4차년도에 위에서 선발된 5개의 F₂ 분리집단(총413개체)을 과종하여 *pun1*-SCAR 마커와 신미 함량을 함께 조사하였다. 135T는 신미 계통으로 정상적인 *Pun1/Pun1* 유전자를 가지고 있는 반면에 147PK는 무신미 계통으로 기능이 없는 *pun1/pun1* 유전자를 가지고 있다. 따라서 F₁에서 *Pun1/pun1*으로 heterozygous형으로 존재하기 때문에 F₂에서 *Pun1/Pun1*: *Pun1/pun1*: *pun1/pun1*이 1:2:1로 분리가 일어난다(그림 26). *pun1*-SCAR 마커는 *pun1* 유전자의 결실 여부를 확인할 수 있는 유전자 마커이다. 정상적인 유전자인 *Pun1*은 결실 부위가 없어 증폭된 크기가 큰 반면 비정상적인 유전자인 *pun1*은 결실 부위가 존재해 증폭된 크기가 작다(그림 26). 실제 *pun1*-SCAR 마커를 분석한 결과, 예상했던 대로 1:2:1의 분리비가 나타났다(표 12).

또한 135T와 147PK 조합의 F₂ 분리집단에서 신미(capsaicin과 dihydrocapsaicin) 함량을 HPLC 방법으로 분석하였다. 예상했던 대로 마커분석을 통해 *pun1/pun1* 유전자형으로 분석된 고추 과실의 신미 함량은 모두 0mg/100g·DW로 나타났다. 그리고 capsaicin 함량과 dihydrocapsaicin 함량은 정의 상관관계를 보였는데 상관계수(*r*)가 0.834였다(그림 27).

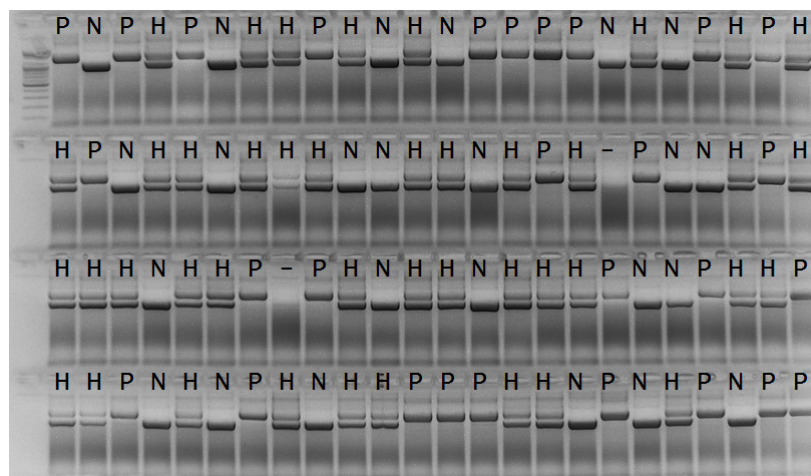


그림 26. 135T x 147PK 조합의 F₂ 분리집단에서 *pun1*-SCAR 마커 분석 결과.

P, *Pun1/Pun1*(homozygous pungent); N, *pun1/pun1*(nonpungent); H, *Pun1/pun1* (heterozygous

pungent)

표 12. 135T x 147PK 조합의 F₂ 분리집단에서 pun1-SCAR 마커 분리 양상.

F ₂ 집단	총 개체수	pun1-SCAR 마커			기대 분리비	x ² -test	P값
		P	H	N			
		<i>Pun1/Pun1</i>	<i>Pun1/pun1</i>	<i>pun1/pun1</i>			
3-2	66	18	35	13	1:2:1	1.000	0.607
3-4	93	21	49	23	1:2:1	0.355	0.837
3-5	86	20	44	22	1:2:1	0.140	0.933
3-10	83	17	47	19	1:2:1	1.550	0.460
3-14	85	20	50	15	1:2:1	3.240	0.198
합계	413	96	225	92	1:2:1	3.390	0.183

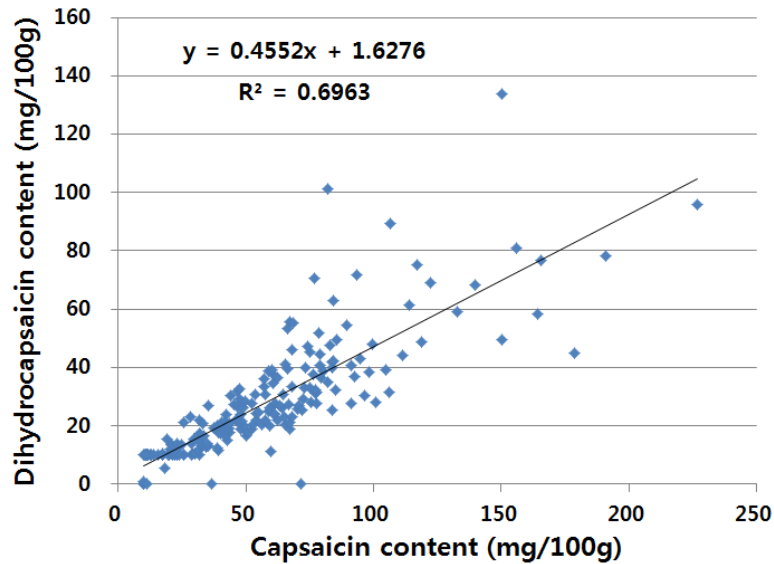


그림 27. 135T x 147PK 조합의 F₂ 분리집단에서 capsaicin 함량과 dihydrocapsaicin 함량 간의 상관관계 그래프.

그리고 신미(capsaicin, dihydrocapsaicin 및 total capsaicinoids) 함량에 대한 분포도를 그려 유전분석을 수행하였다(그림 28). 총 413개체 중에서 pun1-SCAR 마커로 *pun1/pun1* 유전자형으로 나타난 92개체를 제외하고, 나머지 개체 중에서 과실을 수확하여 신미 함량을 분석할 수 있었던 210개체를 대상으로 하였다. 모든 분포도에서 전체적으로 신미 함량이 낮은 쪽으로 치우쳐져 있다. 이는 일반적으로 열성 유전자가 관여될 때 나타나는 그래프 형태이다. 하지만 분석 시작 당시 가설은 우성 유전자가 관여할 것이라고 했기 때문에 이는 앞뒤가 맞지 않는 설명이 된다. 따라서 다른 가능성은 신미 함량을 높이는 유전자가 *pun1* 유전자와 연관이 되어 마커 선발에서 재조합체

(recombinants) 빼고 모두 제외되었기 때문일 수도 있고, 다른 가능성은 신미 함량을 높이는 유전자가 다수 존재해 이들 유전자 모두가 있어야 신미 함량을 높일 수 있는 경우일 것이다.

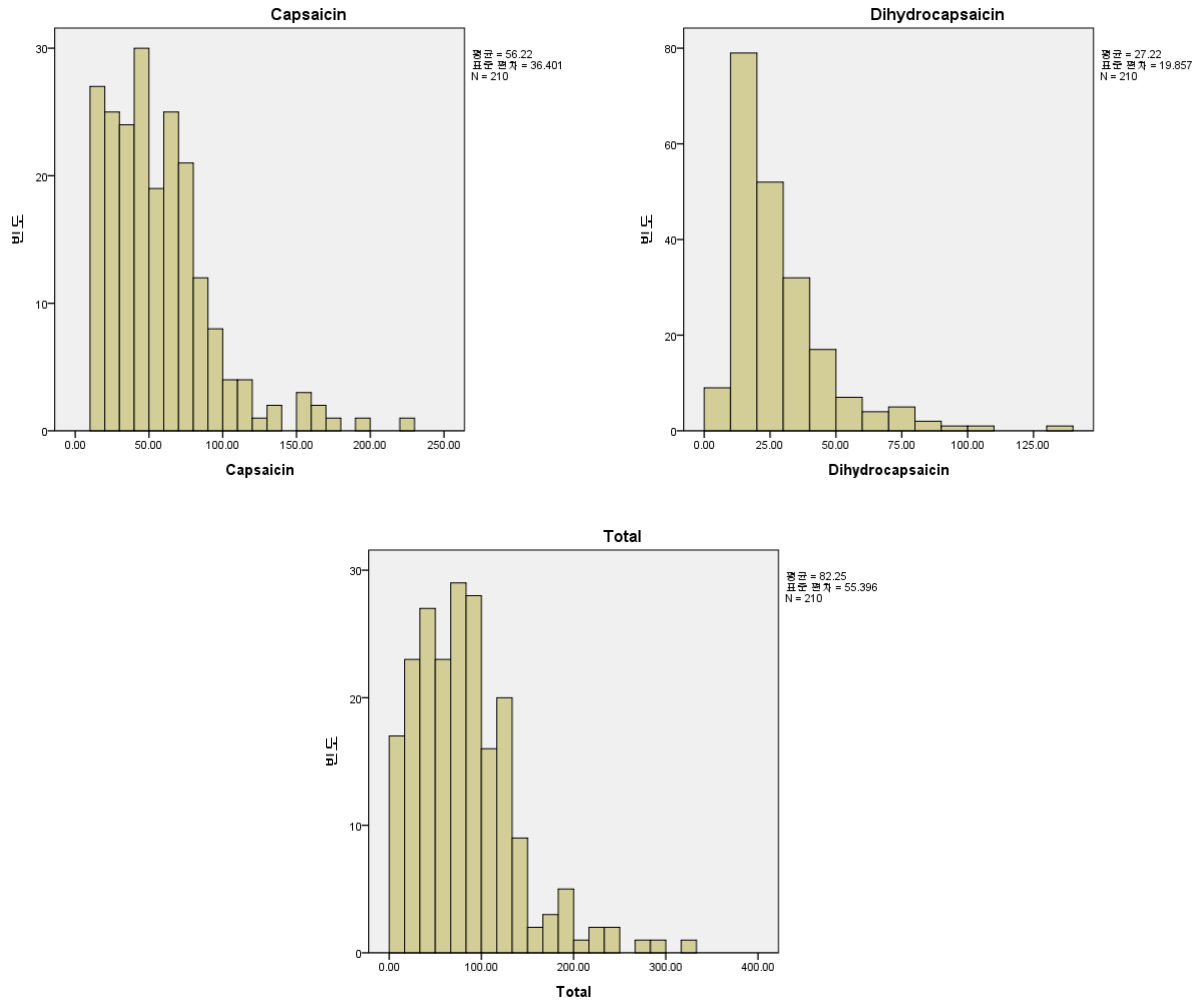


그림 28. 135T x 147PK 조합의 F₂ 분리집단에서 capsaicin, dihydrocapsaicin 및 total 함량 분포도.

4절 약용 및 식량작물의 고품질 육종 분자마커 개발 (제2-1 세부과제)

1. 인삼과 근연속 약용식물의 품종 및 기원 판별용 DNA 마커 개발 및 지원

가. 고려인삼 품종구분 마커 개발 및 실용화

(1) 고려인삼의 발현 유전자 서열을 이용한 SSR 마커 개발

SSR(Simple sequence repeats)은 유전체 내에 10bp 내의 작은 염기서열들이 반복적으로 존재하는 부분으로 같은 종 내에서도 품종 및 개체 간 반복개수의 차이를 보이고 유전체 내에 매우 빈번하게 존재한다. 이를 이용한 SSR마커는 높은 변별력과 재현성, 그리고 근연종 간의 교차 적용성을 가지고 있어 다른 DNA 마커보다 이용성이 높은 장점을 가지고 있다. 이 마커를 개발하기 위해서는 먼저 염기서열 정보가 필요한데, 인삼에서는 전체유전체서열은 아직 밝혀져 있지 않았고 이미 생산된 발현 유전자 서열들이 있어 이를 이용하였다. 발현 유전자 유래 SSR 마커는 유전자 기능과 형질들을 연관시켜 연구를 할 수 있고, 근연종에 적용이 잘되기 때문에 유용하다.

발현 유전자 서열은 공공 데이터베이스인 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 에서 일부 내려 받고, 한국생명공학연구원에서 일부 제공받았다. 이 서열들에서 RepeatMasker 라는 프로그램을 통해 SSR motif를 지닌 서열들을 추려내었고, 프로그램을 돌리는 과정 중 보다 다형성을 높이기 위해 poly 라는 옵션을 줘서 SSR motif들이 연속적으로 5개 이상이 되는 서열들만 뽑아내었다 (표 1-1).

표 1-1. RepeatMasker Program으로 SSR motif 검색 결과.

Total sequences	Total Length(bp)	Transposable element	Low complexity	Simple repeat
22129	12498560	793	1809	2193

그 후 Primer3 프로그램 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) 으로 SSR motif가 포함되게 하여 양쪽 프라이머를 서열이 23bp에서 최대 30bp, melting Temperature(Tm)는 60도 정도, GC%는 20-80%가 되게 제작하였다. 인삼품종은 고정이 덜 되어 품종 내 변이가 있어 주밴드 패턴을 알기 위하여 금풍, 황숙, 연풍, 천풍, 고풍, 자경을 15-20개체의 DNA를 섞어 PCR 주형으로 삼았다. 또한 근연종과의 다형성 확인을 위해 추가로 화기삼(*panax quinquefolius*) 5개체의 DNA를 혼합해 실험에 사용하였다. 예상되는 증폭산물의 크기는 100-300bp로, PCR을 denaturation 20초, annealing 20초, extension 15초의 조건으로 35 반복 수행하였다. 증폭된 산물들은 Agarose gel electrophoresis(AGE)를 통하여 증폭여부를 확인하고, 샘플간 다형성 확인을 위해 Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 수행하였다. 사용된 PAGE의 gel 농도는 9%이고, 100v 100mA의 전압, 전류에서 전기영동이 실시되었다.

디자인한 총 프라이머 개수는 123쌍으로, 그 중 PCR을 성공한 프라이머는 113쌍이었다. 그 중 국내 인삼 간 차이를 보이는 마커는 22개로 조사되었다. 더불어 인삼과 화기삼을 구별할 수

있는 마커는 58개였다 (그림 1-1, 그림 1-2).

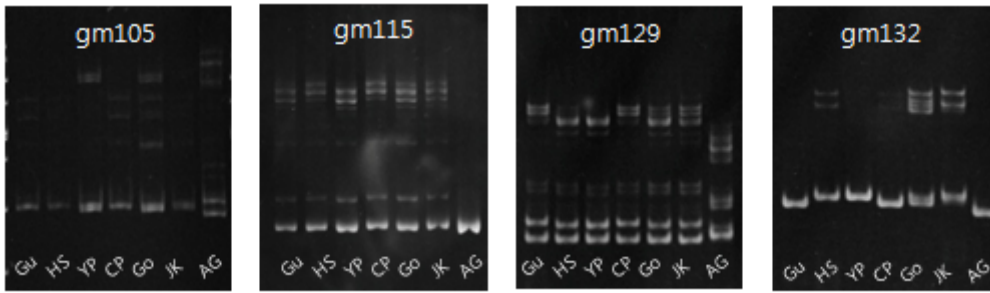


그림 1-1. 국내 고려인삼 간 다형성 보이는 마커 중 일부 사진.
Gu, 금풍; HS, 황숙종; YP, 연풍; CP, 천풍; Go, 고평; JK, 자경종; AG, 화기삼

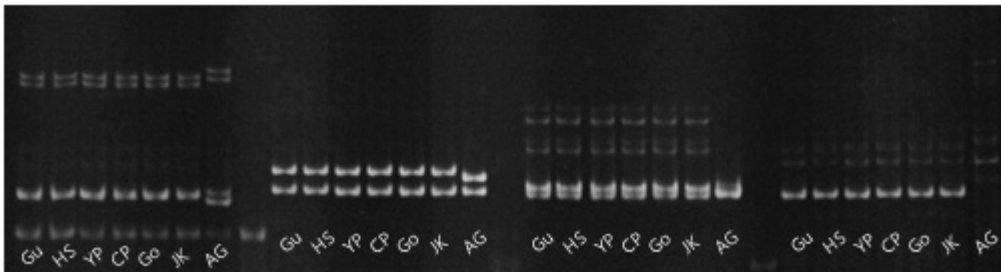


그림 1-2. 고려인삼과 화기삼 간 다형성 보이는 마커 중 일부 사진.

(2) 발현유전자서열 유래 마커의 대사 관련 유전자 탐색

인삼 유전체에 관련한 연구가 많이 진행되지 않았기 때문에 1, 2차년도에는 여러 서열 및 여러 마커를 이용하여 고려인삼 품종간 다형성을 보이는 DNA마커 개발을 중점적으로 진행하였다. 3차년도에는 대사 관련 유전자 탐색 및 관련 마커 개발을 위하여 기 개발된 마커에 대해 DNA 염기서열을 단백질 서열로 번역하여 일치하는 단백질을 찾아주는 프로그램인 blastx 분석을 통하여, 유전자와 마커의 상관관계를 탐색하였다. 현재까지 발현유전자 서열을 기반으로 개발된 SSR 마커는 58개였는데, 이 마커들의 기반이 되는 발현유전자 서열을 NCBI의 non-redundant(nr) 단백질 데이터베이스에 blastx를 통해 매칭 되는 후보 유전자를 검색하였다. 그 결과 58개의 서열 중 37개가 후보 유전자들이 탐색되었다 (표 1-2).

표 1-2. 대사 관련 SSR 마커들과 후보 유전자

Marker	Putative gene function	E-value
g079	3-hexulose-6-phosphate isomerase [Ricinus communis]	4.00E-15
g081	extensin, proline-rich protein, putative [Ricinus communis]	1.00E-30
g082	N-acetylglucosamine kinase [Ricinus communis]	1.00E-17
gm008	conserved hypothetical protein [Ricinuscommunis]	1.00E-49
gm021	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase [Dahlia pinnata]	5.00E-16
gm024	50S robosomal protein L11, putative [Ricinus communis]	2.00E-56

Marker	Putative gene function	E-value
gm025	subtilisin-like protease [Vitis vinifera]	1.00E-117
gm026	predicted protein [Populus trichocarpa]	8.00E-07
gm031	uncharacterized protein LOC100251924 [Vitis vinifera]	8.00E-17
gm045	2,3-dimethylmalate lyase [Vitis vinifera]	1.00E-69
gm047	predicted protein [Populus trichocarpa]	8.00E-07
gm058	beta-galactosidase a-peptide [Cloning vector pTriplEx2]	6.00E-16
gm065	glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like protein 3 [Vitis vinifera]	9.00E-59
gm099	Beta-glucosidase [Medicago truncatula]	3.00E-05
gm105	jasmonate-zim-domain protein 1 [Prunus persica]	7.00E-08
gm119	abscisic acid receptor PYL4-like [Vitis vinifera]	2.00E-99
gm129	transcription factor WRKY4 [Petroselinum crispum]	4.00E-29
gm131	beta-amylase [Vitis vinifera]	0
gm134	proteinELF4-LIKE4[Vitisvinifera]	5.00E-47
gm137	glutathione transferase GSTU45 [Populustrichocarpa]	2.00E-94
gm139	uncharacterized protein LOC100782686 [Glycine max]	3.00E-04
gm148	basic blue copper protein [Cicer arietinum]	2.00E-47
gm159	PR10-2 [Panax ginseng]	3.00E-93
gm160	pathogenesis-related protein 10 [Panax ginseng]	2.00E-93
gm166	MADS-box protein SOC1 [Vitis vinifera]	5.00E-60
gm175	predicted protein [Populus trichocarpa]	8.00E-54
gm176	transcription factor, putative [Ricinus communis]	8.00E-28
gm184	unnamed protein product [Vitis vinifera]	1.00E-28
gm205	uncharacterized protein LOC100261429 [Vitis vinifera]	6.00E-13
gm206	Ribonuclease T2 [Medicago truncatula]	6.00E-28
gm213	uncharacterized protein LOC100258791 [Vitis vinifera]	9.00E-10
gm214	thioredoxin [Limonium bicolor]	1.00E-46
ptr010	tRNA pseudouridine synthase A [Vitis vinifera]	3.00E-100
ptr027	group I late embryogenesis abundant protein [Brassica napus]	3.00E-24
ptr032	uncharacterized protein LOC100820109 [Glycine max]	9.00E-08
ptr040	overexpressor of cationic peroxidase 3 [Arabidopsis thaliana]	3.00E-24
ptr041	putative glucose-6-phosphate 1-epimerase [Vitis vinifera]	1.00E-75

탐색된 37개의 마커서열 중 2개는 인삼에서 이미 보고된 유전자로 병원균과 연관된 유전자였다. 나머지 35개는 다른 식물들의 유전자와 상동성을 보였고 그 중 10개는 아직 기능이 밝혀지지 않은 단백질이었다. ptr010 마커의 경우 천풍에 특이적으로 다형성을 보이는데 (그림 1-3), 해당하는 서열의 후보유전자는 tRNA pseudouridine synthase A 이다. 이 효소는 RNA 샤페론으로, tRNA의 38, 39, 40 번째의 uridine을 pseudouridine으로 바꾸는 것으로 알려져 있다.

표 1-3. EST서열 기반 탐색된 SNP 수

	천풍	연풍	금풍	고풍	총합
putative SNPs	6,728	27,715	21,286	18,118	56,928

천풍의 reference contig들을 blastx 검색 결과 그 중 4933개의 contig에서 후보유전자가 탐색되었고, 그 중 90개의 서열에 대해서 천풍과 연풍의 dCAPS(Derived Cleaved Amplified Polymorphism Sequences)마커를 디자인하였다. 천풍과 연풍은 품종으로 등록된지 가장 오래되었고, 또한 두 품종은 유래되는 재래종이 다르기 때문에 인삼의 품종들 중 유연관계가 가장 멀다고 할 수 있다. dCAPS마커는 SNP 주위의 염기서열을 하나 혹은 두 개를 제한효소로 자를 수 있게 변형하여 프라이머를 제작하는 방법으로, 연풍과 천풍 중 한 개의 품종만 잘리도록 제작하였다. 다형성을 젤 상에서 확인한 결과, 표 1-4과 같이 나왔다.

표 1-4. SNP-dCAPS 마커 개발 결과 요약

제작한 프라이머 수	PCR 증폭		다형성 여부
	성공	실패	
90	57	23	1

PCR 증폭은 57쌍이 되었고, 연풍과 천풍 간에 다형성을 보이는 프라이머는 1쌍뿐이었다 (그림 1-5A). 제한효소를 처리하였을 때, 둘 중 하나의 품종만 잘려서 다형성을 보이도록 설계되었으나, 천풍과 연풍이 둘 다 잘리거나, 둘 다 잘리지 않아 다형성을 나타내지 않는 것이 일반적이었다 (그림 1-5B, C). 제한효소 처리 전 밴드와 잘리고 나서의 밴드 크기가 동시에 관측되는 hetero형의 경우도 다수 존재하였다 (그림 1-5D).

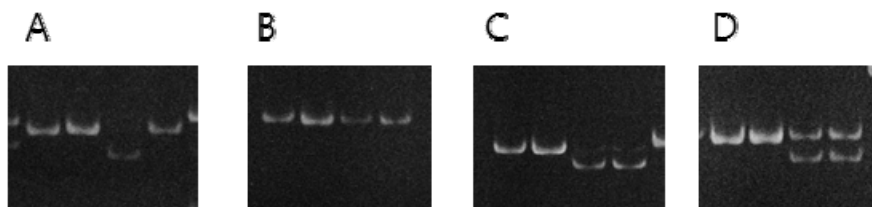


그림 1-5. A-D는 dCAPS 마커 실험결과에서 나타나는 형태. 왼쪽 두 lane은 PCR 산물, 오른쪽 두 lane은 제한효소 처리 후.

발현유전자 서열정보에 기반한 SNP 마커 개발은 예측한 것과 같은 결과를 도출하지 못하였는데 그 원인은 발현유전자 서열을 통해 예측된 정보와 인삼 유전체 내의 상황이 일치하지 않기 때문으로 추측된다. 인삼은 세대가 최소 4년으로 길어 각 품종 내 유전체의 고정성이 덜 진행되었고, 이로 인해 인삼 SNP의 대립형질이 hetero상태로 존재 가능하다. 또한 유전체가 배가되어 유사성이 높은 paralogous copy가 여러 개 존재하여 이로 인한 SNP 탐색이 부정확할 수 있다. 추후 이런 것들을 해결해야만 인삼에서 SNP 마커가 가능할 것으로 보인다.

(4) 신속분석을 위한 EST-SSR마커의 HRM마커 전환

HRM기술은 PCR 과정 한번으로 샘플 간 SNP 및 길이차이를 볼 수 있는 간단하면서도 빠르게 분석 가능한 강력한 기술이다. SSR마커는 길이차이를 기반으로 다형성을 보이는 마커이기 때문에 이론적으로 HRM분석을 통해서도 차이를 보인다. 따라서 1차년도에 개발된 발현유전자 유래 SSR 마커를 HRM분석에 적용하였고, 사용된 마커는 본 연구진이 과학재단 과제 수행 중에 개발한 마커 중 일부가 사용되었다. 아래의 그림과 같이 PAGE 젤에서 분석된 사진과 HRM분석결과가 같은 마커를 6개를 찾았다 (그림1-6).

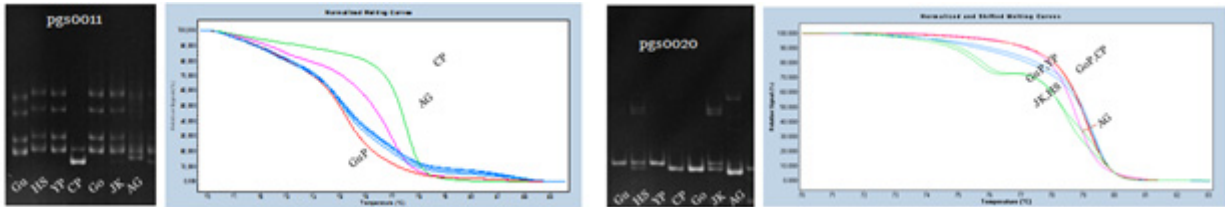


그림 1-6. SSR 마커 그림과 그 마커를 HRM에 적용하여 나온 그래프 비교 사진.

기존의 분석방법의 경우 PCR 후, 아가로스 및 아크릴아마이드 전기영동을 해야하는 반면(대략 4시간의 시간 소모), HRM 분석은 PCR 후 30분의 분석을 통해 결과가 나오므로 다량의 샘플을 신속하게 구분 가능하다. 따라서 인삼 종자 순도 검정 등 다량의 샘플 검정에 유용하게 이용될 수 있다..

(5) RAPD를 이용한 국내 고려인삼 품종 구분 마커 개발

1차년도에 인삼의 마커 수를 늘리기 위하여 RAPD(Random amplified Polymorphic DNA)를 이용하여 국내 고려인삼 품종을 구분 할 수 있는 마커개발을 시도하였다. 분석에 사용된 프라이머는 Operon technology에서 나온 RAPD용 프라이머와 decamer base pairs primer인 UBC(Univ. of British Columbia, Vancouver, BC. Canada)프라이머이다. Operon technology에서 나온 프라이머는 OPAA~OPAJ까지 각각 20개씩과 OPBA~OPBH 20개씩, OPS, OPT, OPV, OPX, OPY, OPZ 각각 20개씩으로 전체 440개가 있고, UBC 프라이머는 1번부터 800번까지 있다. 이 중에서 OP 프라이머 440개와 UBC 프라이머는 1번부터 288개, 전체 728개의 primers를 이용하여 4개의 계통을 대상으로 다형성을 찾기 위하여 RAPD를 수행하였다. 실험에 사용된 인삼 품종은 천풍, 연풍 과 금풍, 황숙 4종이다. 황숙은 재래혼계종이지만 금풍과 외형이 똑같아 홍삼을 만들기 전까진 금풍과 구별하지 못해, 농가에서 황숙종과 금풍을 혼동해서 사용하는 경우가 있다. 따라서 농가에서 이런 불이익을 받지 않기 위하여, 황숙종과 금풍을 구별할 수 있는 마커를 개발하기 위하여 금풍, 황숙을 사용하였다.

전체 728종의 프라이머를 이용하여 분석한 결과 아래 표와 같이 전체 553개의 밴드를 획득하였으며 이 중 62개가 어느 한 계통에서 다형성을 보여주었다(표 1-5, 그림 1-7, 그림 1-8).

표 1-5. RAPD 분석 결과 정리.

구분	프라이머 수	증폭된 프라이머 수	전체 밴드 수	평균 밴드 수	다형성 프라이머 수	다형성 밴드 수
Operon	440	342	1436	4.2	40	161
UBC	288	211	823	3.9	22	81

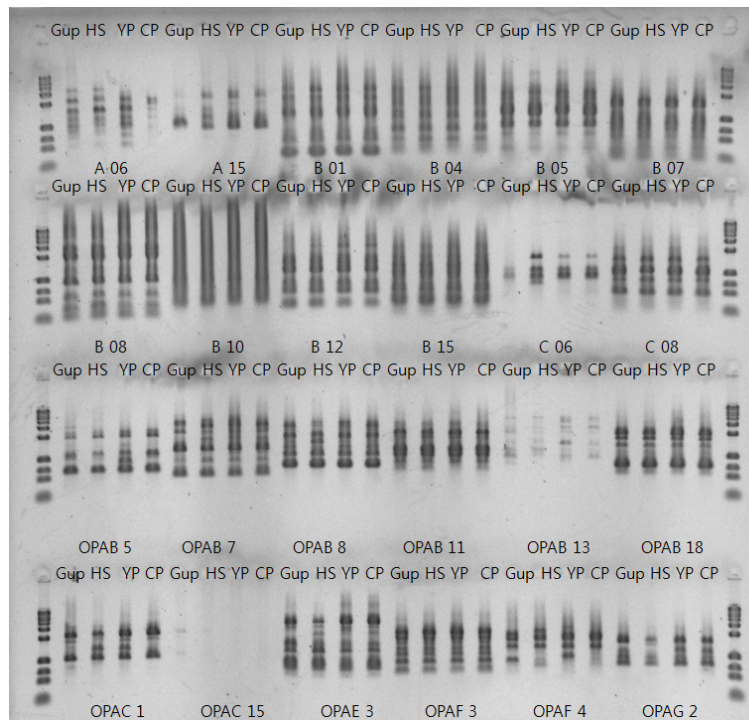


그림 1-7. OPA* 프라이머를 사용하여 아가로스 젤 분석을 한 사진.

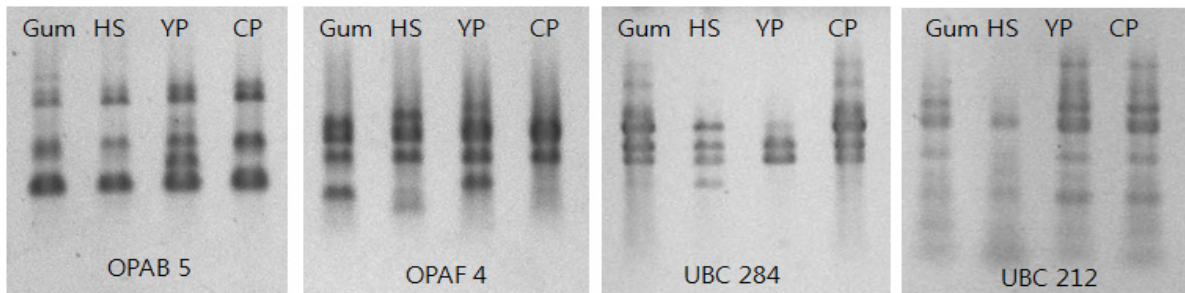


그림 1-8. 품종간에 차이를 보이는 프라이머 중 일부 사진.

RAPD분석은 실험의 재현성 부재가 주요 문제점으로 꼽히는데, 이를 극복하기 위하여 다형성을 보이는 프라이머들은 2차와 3차 실험을 통해 반복적으로 다형성을 보이는지 조사하였다. 반복한 실험에서도 같은 밴드 패턴이 나온다면 STS(sequence tagged site)마커로 전환해야 되는데, 여러 번의 반복 실험에도 재현성이 떨어지는 현상이 계속해서 발생하였다 (그림 1-9).

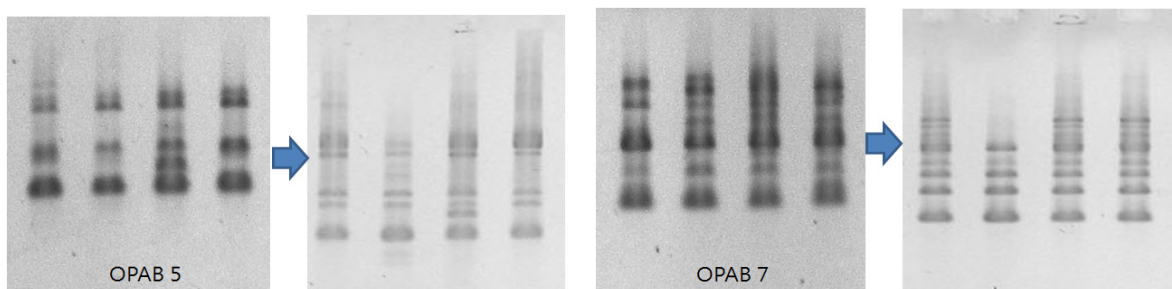


그림 1-9. 차이 나는 프라이머를 다시 분석한 사진.

반복 실험으로도 RAPD의 재현성 문제는 해결되지 않았고, 이는 인삼 유전체에 복잡성 때문으로 생각되어 RAPD마커를 이용한 국내 고려인삼 품종 구분은 더 이상 진행하지 않았다.

(6) 인삼 유전체 서열을 이용한 SSR 마커 개발

본 연구실에서는 차세대염기서열분석기술을 통한 인삼의 whole genome shotgun sequencing을 진행 중에 있는데, 이를 통해 생산된 작은 염기서열 단편들을 assembly하여 발현 유전자 유래 SSR 마커를 개발하는 과정과 거의 동일하게 유전체 서열 유래 SSR 마커를 2차년도에 개발하였다. assembly 된 contig서열들 중 Tandem Repeat Finder 프로그램을 통해 SSR을 포함한 서열들을 검색한 결과 241,331개의 SSR이 확인되었다. Primer3 프로그램으로 SSR을 포함하는 프라이머쌍을 디자인하였고, 빠른 실험 진행을 위하여 천풍과 연풍 두 개의 샘플을 이용하여 PCR분석 하였다. 증폭된 산물들은 9% PAGE 분석을 통하여 다형성을 확인하였다. 제작한 프라이머는 총 411쌍이었고, 그 중 차이를 보이는 마커는 23쌍이었다. 사용된 시료가 적었기 때문에 마커개발률이 좋지 않았지만 이렇게 개발된 마커들은 후에 유전지도 작성에 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

나. 고려인삼의 품종구분용 마커조합 개발 및 분석서비스 지원

(1) 고려인삼 모든 상용품종 구별을 위한 SSR 마커조합 개발 및 검정

본 연구에서는 고려인삼의 품종 구별을 위하여 인삼의 DNA 서열을 기반으로 1, 2차년도에 품종 간 다형성을 보이는 SSR마커를 개발하였다. 모든 상용품종 구별을 위해 현재까지 육성된 품종 9개(천풍, 연풍, 금풍, 고평, 선풍, 선운, 선원, 청선, 선향)를 재료로 하여, 발현유전자서열 기반 SSR마커로 스크리닝을 하였다. 그 결과 총 6개의 마커의 조합을 가지고 인삼의 모든 상용 품종을 구분할 수 있었다 (그림 1-10).

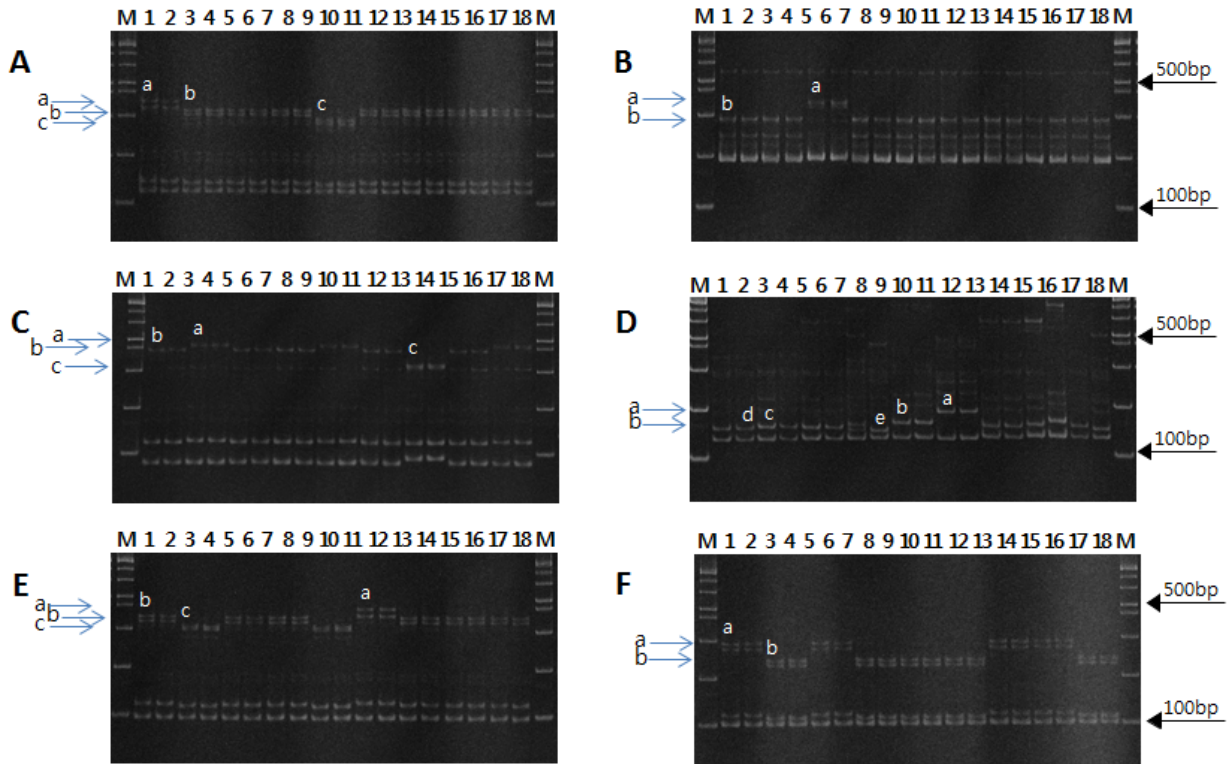


그림 1-10. 고려인삼 품종 구별을 위한 6개 마커조합 및 유전형

(A) gm47n, (B) gm104, (C) gm175, (D) gm184, (E) gm 129, (F) gm45n.

M: 100bp DNA ladder, Lanes: 1-2, 천풍; 3-4, 연풍; 5-6, 금풍; 7-8, 고품; 9-10, 선풍; 11-12, 선운; 13-14, 선원; 15-16, 청선; 17-18, 선향.

마커 조합 중 gm47n 마커는 3개의 대립형질을 보였는데 그 중 2개가 각각 천풍과 선풍에 특이적으로 나타났다. 따라서 천풍과 선풍은 gm47n 마커 하나로 감별할 수 있었다. gm104 마커의 경우 두 개의 대립형질을 보였는데 그 중 한 개가 금풍에 특이적이었고, gm175 마커는 3개의 대립형질 중에 한 개가 선원에 특이적이었다. 그리고 gm184 마커와 gm129 마커의 한 개의 대립형질이 선원 특이적이었다. 종합하면 4개의 마커로 천풍, 선풍, 금풍, 선운, 선원 5개의 품종을 구별할 수 있었고, 나머지 4개의 품종은 마커의 조합으로 구별할 수 있었다 (표 1-6).

표 1-6. 품종 판별을 위한 마커조합

Cultivar Name	Original landrace	Alleles for each marker					
		gm47n	gm104	gm184 ¹⁾	gm175	gm129	gm45n
Chunpoong	Chunkyung	<u>a</u>	b	b (d)	b	b	a
Yunpoong	Jakyung	<u>b</u>	b	b (c)	a	<u>c</u>	b
Gumpoong	Hwangsook	b	<u>a</u>	b (d)	b	b	a
Gopoong	Jakyung	<u>b</u>	<u>b</u>	b (c/e,e)	<u>b</u>	<u>b</u>	<u>b</u>
Sunpoong	Jakyung	<u>c</u>	b	b	a	c	b
Sunun	Jakyung	b	b	<u>a</u>	b	<u>a</u>	b
Sunone	Jakyung	b	b	b (d)	<u>c</u>	b	a
Cheongsun	Chunkyung	<u>b</u>	<u>b</u>	b (d,b)	<u>b</u>	<u>b</u>	<u>a</u>
Sunhyang	Jakyung	<u>b</u>	b	b (c,d)	<u>a</u>	b	<u>b</u>

1) gm184 마커의 대립형질 중 b-e 형질은 차이가 미미하여 전부 b 형질로 처리함
 각 품종은 색깔이 있는 마커 조합으로 판별 가능함

연풍은 gm47n마커와 gm129 마커의 조합으로, 선향은 gm47n 마커, gm129 마커, gm175 마커의 조합으로 구분할 수 있었고, 고풍과 청선은 gm47n, gm104, gm175, gm129, gm45n 다섯 개 마커의 조합으로 구분할 수 있었다.

연풍과 천풍을 교배하여 재배되고 있는 F1 식물 8개체의 교배 여부를 개발된 마커조합을 통하여 분석하였다 (그림 1-11). 그 결과 어떤 개체가 연풍과 천풍이 성공적으로 교배되는 지 알 수 있었다.

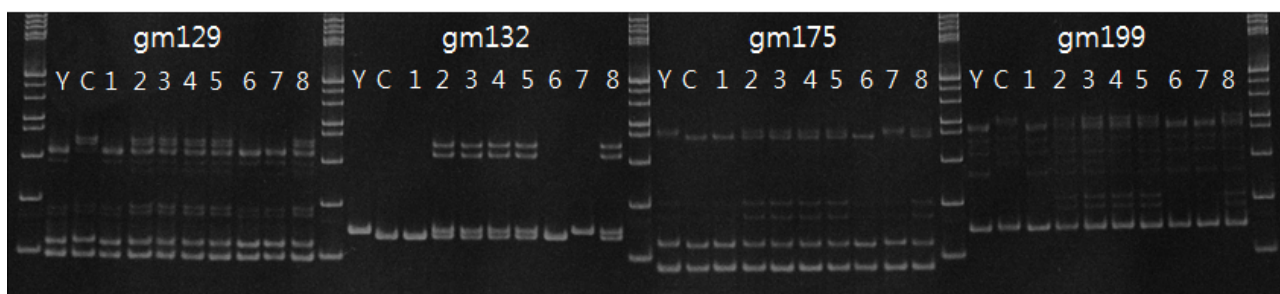


그림 1-11. F1 식물의 교배여부확인을 위한 개발한 마커의 적용

특히 무작위로 순서를 섞어놓은 인삼 70개체에 테스트해보았는데, 성공적으로 품종을 감별하였다 (그림 1-12). 이 마커 조합은 향후 많은 곳에 사용될 수 있다. 특히 9개의 품종을 최소 5개의 마커로 감별이 가능하기 때문에 품종을 구별하는데 빠른 시간 내에 분석이 가능하다.

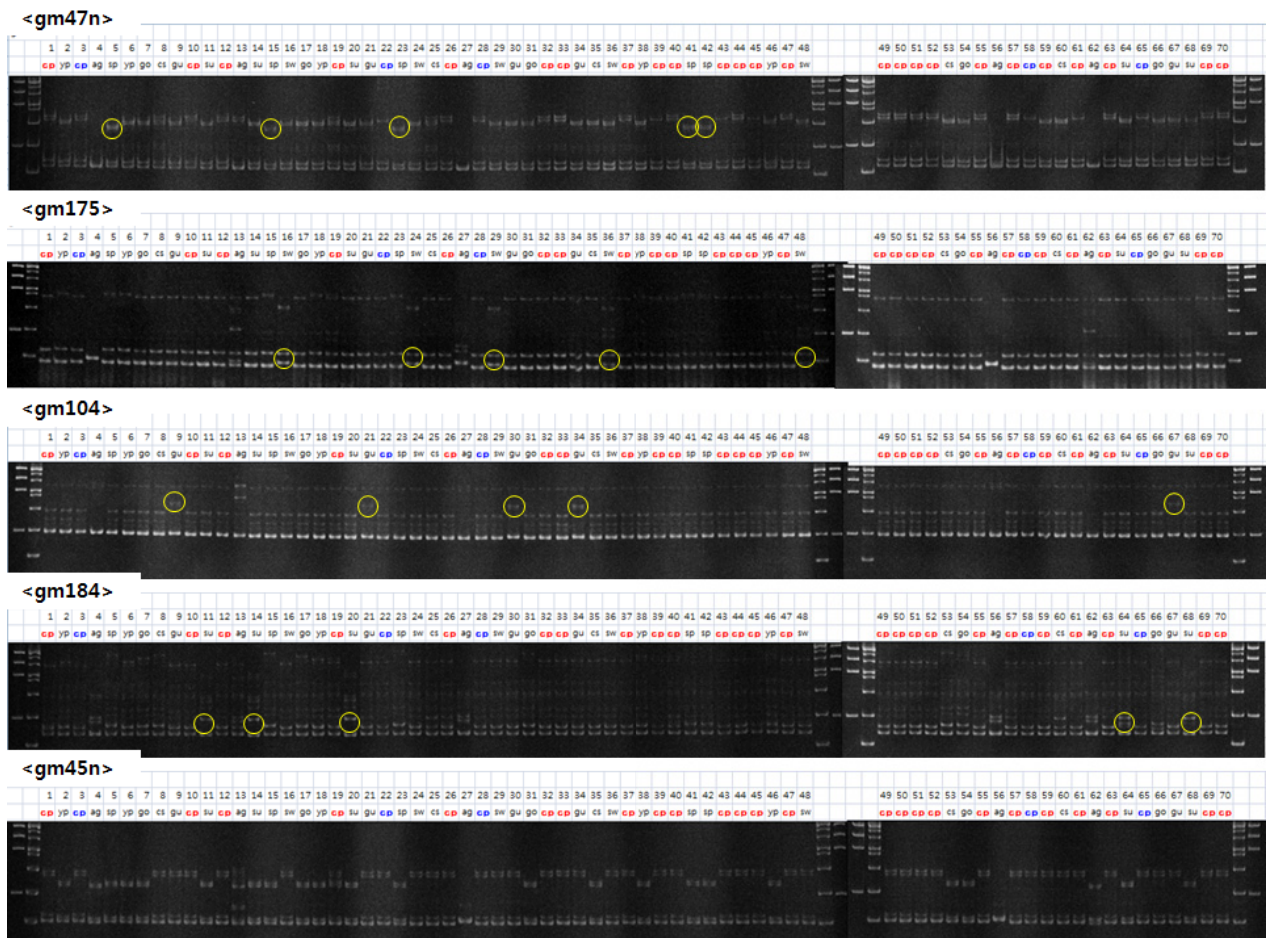


그림 1-12. 5개의 마커조합으로 70개 샘플에 적용한 결과

현재 인삼의 품종이 9개가 육성이 되었지만 인삼시장에 유통되는 인삼은 전부 재래종이라 할 수 있다. 이는 품종의 보급이 원활하지 않고, 유통 체계 등이 부족하기 때문이다. 또한 품종이 보급되기 위해서는 종자의 균일도가 중요한데, 위에서 개발한 마커조합은 품종의 순도 유지에 많은 도움이 될 것이라 사료된다. 또한 앞으로 품종이 보급되면 각 품종의 동정 및 시장에서 인삼제품의 투명한 유통체계 확립에도 도움이 되며, 우리나라 인삼의 국제경쟁력 확보에도 이바지 할 것이다.

(2) SSR-HRM 마커를 이용한 천풍 품종의 순도 검정 지원

1차년도 연구 수행 중, KT&G에서 천풍 품종 658개체에 대해서 순도 검정을 의뢰받아서 HRM이 가능하고, 천풍이 뚜렷하게 구분되는 마커 3개를 사용하여 순도 검정 실시를 하였다 (그림 1-13).

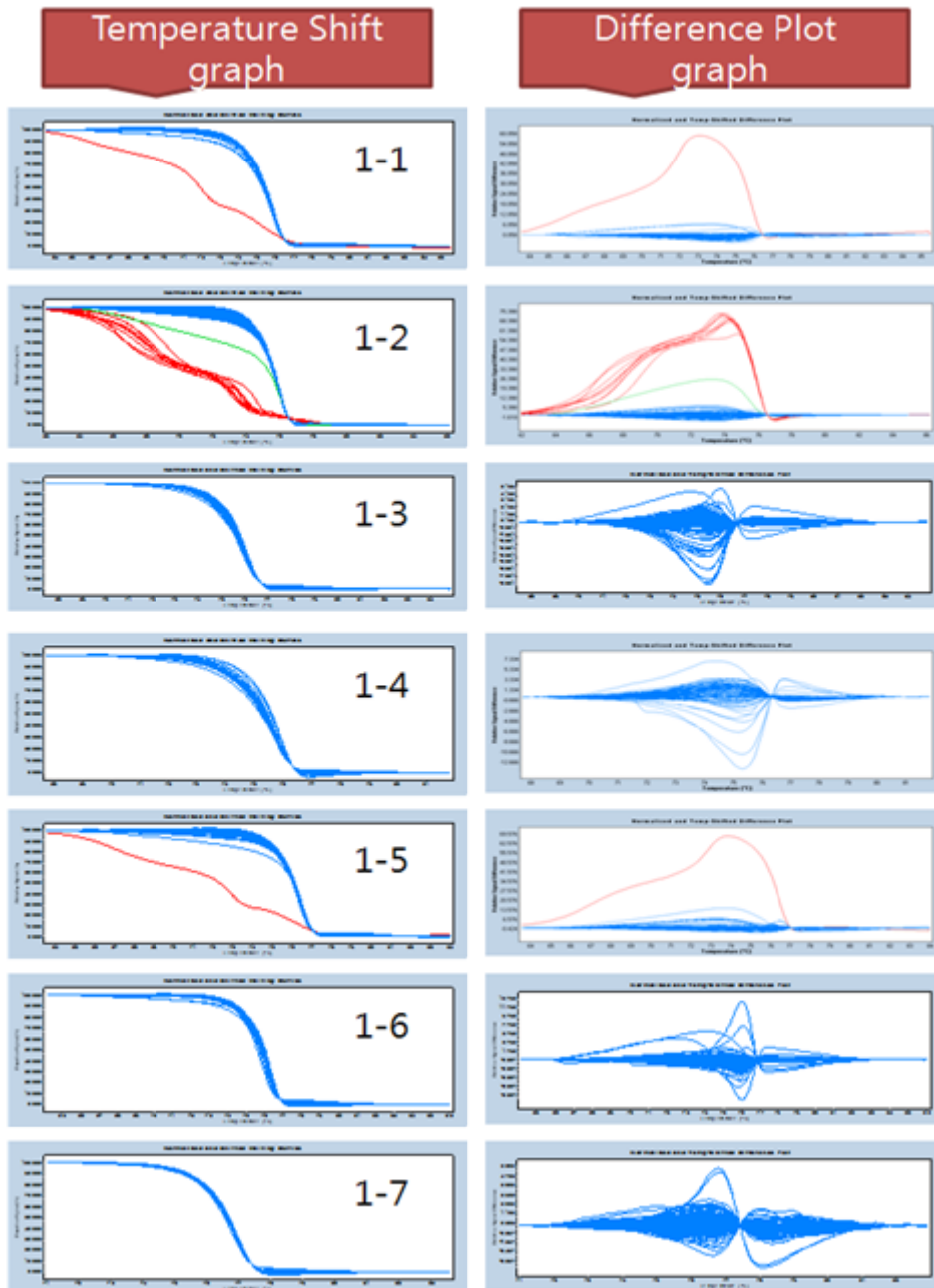


그림 1-13. HRM을 실시하여 천풍 품종 순도검정 한 그래프.

위의 그림은 3개의 마커 중 1개의 마커로 658개 개체 순도검정을 한 그래프이다. Temperature Shift 그림은 HRM의 분석 그래프이고, Difference plot은 Temperature Shift 그림의 주 밴드를 하나로 놓고 그 높낮이를 그린 그래프이다. Temperature Shift 그림에서 파란색으로 나온 개체들이 천풍을 의미하고, 그 외의 빨간색이나, 초록색은 천풍이 아닌 것을 의미한다. 분석은 마커 1개 당 하루 정도 걸려 총 3일이 걸렸고, 3개의 마커를 사용한 결과를 종합하여 658개체 중 568개(86.5%)만이 진짜 천풍이고, 나머지 것들은 천풍과 비슷하거나, 다른 품종과 교잡이 일어난 개체라고 결과를 내었다. 658*3 개수의 데이터를 3일만에 생산하였고, 천풍이 아닌 개체들끼리의 그래프 그림도 비슷하여 결과를 신뢰할 수 있다. 이렇게 개발된 SSR-HRM 마커는 인삼 종자 증식을 위하여 실용적으로 쓸 수 있다. 인삼은 자식성 작물이기 때문에 부모가 Heterozygous하면 후대(그 개체의 종자)는 유전형이 분리된다. 따라서 이

SSR-HRM 마커를 통해 Heterozygous한 개체들은 골라내고 천풍 종자를 수확한다면 순도가 높아지는 방향으로 유지가 될 것이다.

(3) 품종구분용 마커의 실용적 분석 서비스 지원

본 연구를 통해 개발된 품종구분용 마커조합으로 실용적 분석을 지원하였다. 2011년 총 3번의 품종 구분 분석 지원이 있었다. 다음은 조직배양으로 유도된 인삼부정근의 품종판별 분석이다. 총 29개의 샘플을 13개의 마커를 통해 각각 어떤 품종인지 확인하였다 (그림 1-14).

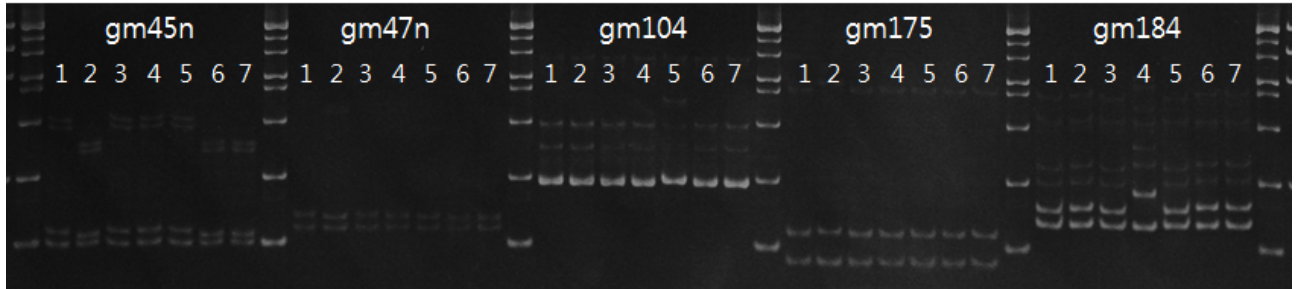


그림 1-14. 인삼부정근의 품종판별을 위해 마커조합의 적용

그리고 인삼 9품종에 대한 종자의 순도검정 분석의뢰가 들어와 진행하였다. 위에서 언급한 대로 육종의 어려움에 기인하여 몇몇 품종은 균일성이 떨어진다. 따라서 종자수준에서 감별하면 순도를 많이 향상시킬 수 있다. 의뢰받은 샘플은 9개의 품종의 각각 50여개의 종자 총 470여개의 종자였다. DNA는 NAOH를 이용하여 간단하게 20여분만에 추출하였고, PCR과 PAGE 전기영동을 통하여 종자의 순도를 검정하였다 (그림 1-15).

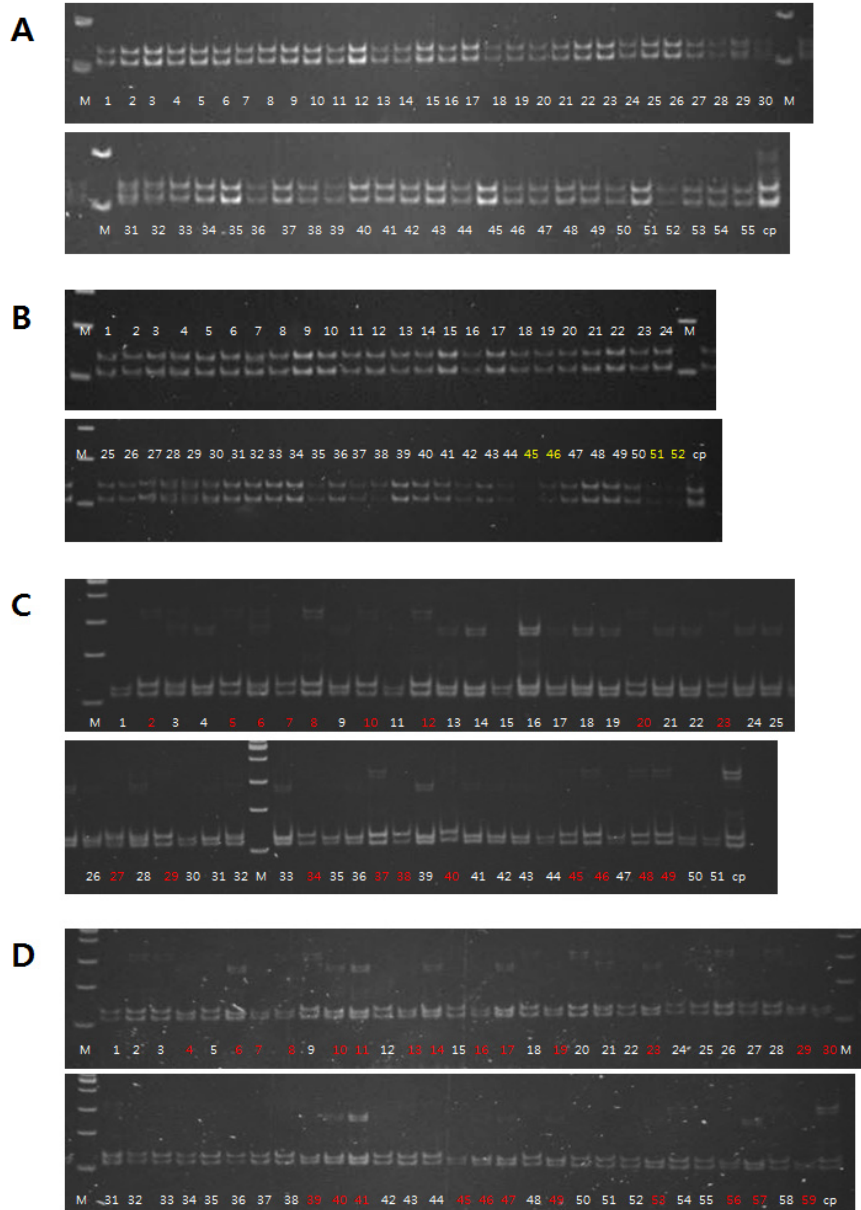


그림 1-15. 품종의 순도 검정 분석 사진.

- (A) 연풍에 적용한 gm129 마커, (B) 선운에 적용한 gm129 마커,
 (C) 고풍에 적용한 gm45n 마커, (D) 청선에 적용한 gm45n 마커.
 노란색은 재검이 필요한 샘플을, 빨간색은 off-type을 의미함

검정 결과 연풍과 선운의 경우 샘플 간 차이가 없는 반면에, 청선과 고풍의 경우 품종 내 샘플 간 변이를 많이 확인되었다. 따라서 청선과 고풍은 균일성이 떨어지고, 순도가 떨어지는 것으로 생각되어진다. 이와 같이 품종을 구분하는 분자 마커는 인삼 산업에 많이 기여할 것으로 생각되어진다.

다. NGS 분석기술을 이용한 인삼 품종별 엽록체 분석

(1) NGS 기술을 이용한 천풍, 연풍의 엽록체 서열 생산

국내에 유통되고 있는 인삼품종은 재래종인 자경, 황숙을 포함한 11개의 품종이 이용되고 있으며, 홍삼제품 생산 및 유통에는 재래종인 자경이 가장 많이 이용되고 있다. 본 연구팀은 여러 품종의 엽록체 분석에 앞서, 기생산된 천풍과 연풍의 유전체 서열정보를 이용하여 두 품종의 엽록체 전체 염기서열정보 분석을 실시하였다 (표 1-7).

표 1-7. NGS로 생성된 천풍과 연풍의 유전체 염기서열 정보

library	Raw data		Data after trim			Coverage (X)	
	Reads No	Reads Length	Reads No	Reads Length	%		
천풍	200bp	1,508,287,446	152,337,032,046	1,300,120,438	130,592,092,908	85.7	43
	300bp	3,624,507,076	367,013,263,718	3,011,868,136	299,941,987,158	81.7	99
	3kb	791,062,796	39,553,139,800	255,833,644	12,657,204,889	32.0	4
	5kb	1,211,158,248	60,557,912,400	178,628,834	8,779,270,156	14.5	3
	10kb	543,884,754	27,194,237,700	48,239,746	2,239,319,599	8.2	1
	20kb	532,701,626	26,635,081,300	73,730,014	3,441,191,273	12.9	1
	40kb	133,573,418	6,678,670,900	6,956,720	323,315,785	4.8	0.1
Total	8,345,175,364	679,969,337,864	4,875,377,532	457,974,381,768	67.4	151	
연풍	300bp	66,750,556	6,741,806,156	66,379,836	6,696,852,307	99.3	2
	300bp	419,204,184	42,339,622,584	393,780,689	38,833,080,522	91.7	14
Total	485,954,740	49,081,428,740	460,160,525	45,529,932,829	96	16	

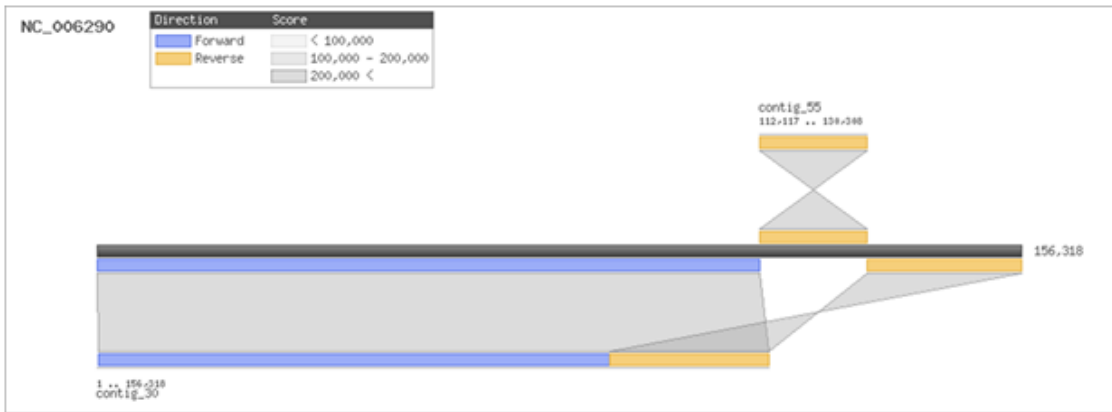
고려인삼의 genome size는 3.2-3.5GB로 추정되는데, 천풍은 전체유전체크기의 0.1X coverage를, 연풍은 0.2X coverage의 data를 이용하였다 (표 1-8).

표 1-8. 엽록체 염기서열 정보 분석을 위해 사용된 천풍, 연풍의 NGS data 정보

품종	Genome Coverage	# of Reads	Total Length(bp)	N50 (bp)	Chloroplast Contigs
천풍	0.1X	2,789	1,638,573	701	2
연풍	0.2X	5,166	2,722,665	526	3

De novo assembly를 통해 엽록체 서열 contig를 완성한 결과, 천풍의 contig는 113,710bp과 18,210bp의 크기를 갖는 2개가 나왔고 연풍은 53,533bp, 44,428bp, 33,084bp의 크기를 갖는 3개의 컨티그가 나왔다. 어셈블된 contigs 서열의 validation을 위해 reference (NC_006290.1) *Panax schinseng* Nees genome에 mapping 하였다 (그림 1-16).

0.1X coverage : Chunpoong



0.2X coverage : Yunpoong

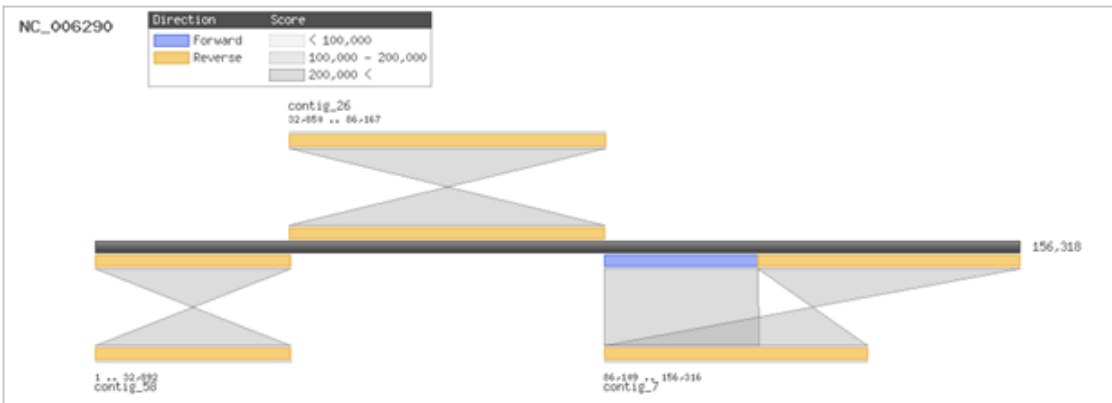


그림 1-16. 천풍과 연풍 유전체체크기 0.1X - 0.2X에 해당하는 서열정보를 이용하여 생성된 contigs와 레퍼런스 NCBI 인삼 엽록체 서열과의 mapping 비교

천풍, 연풍 및 레퍼런스와의 비교에서 겹으로 나타났던 한 부분을 PCR 및 ABI3730xl re-sequencing 하여 최종적으로, 천풍 156,248bp 연풍 156,355bp를 완성하였다. 완성된 엽록체 genome에 참여한 데이터 coverage를 계산한 결과 천풍 94X, 연풍 67X로 나타났고, 사용된 전체 데이터에서 천풍 6%, 연풍 4.2%가 mapping 되었음을 확인하였다

(2) 천풍과 연풍 엽록체 유전체의 유전자 확인과 지도 작성

완성된 천풍과 연풍의 엽록체 유전체 염기서열로 gene annotation을 수행하였다 (표 1-9). DOGMA(dual organellar genome drawer) 프로그램을 이용하였으며 결과, 천풍과 연풍간의 gene order, gene content, gene products에 차이는 나타나지 않았으며 NCBI에 등록된 reference 인삼엽록체와 동일하였다.

표 1-9. 고려인삼 엽록체 유전자 정보

P. ginseng gene product	
	trnM-CAU trnS-UGA trnT-UGU trnL-CAA* trnF-GAA trnV-UAC^
	trnM-CAU trnK-UUU trnY-GUA trnE-UUC trnT-GGU trnS-UGA trnG-UCC
Transfer RNAs	trnV-GAC* trnH-GUG trnS-GCU trnQ-UUG trnS-GGA trnR-ACG* trnC-GCA
	trnD-GUC trnW-CCA trnP-UGG trnP-GGG trnI-GAU*^ trnR-ACG* trnI-CAU*
	trnL-UAA^ trnR-UCU trnA-UGC*^
Photosystem1	psaB psaA ycf3^ psaI ycf4 psal psaC
Photosystem2	psi_psbT psbN psbH psbL psbF psbE psbT psbA psbK
	psbJ psbM psbD psbC lhbA psbG
Ribosomal RNAs	rRNA16* rRNA23* rRNA4.5* rRNA5*
Cytochrome b6/f	petN petA petL petG petB petD
unknown function	ycf2* ycf15* ycf68* orf42* orf56* ycf1* orf188
protein coding gene	
Rubisco	rbcl
ATP synthase	atpA atpF* atpB atpH atpI atpE
	ndhJ ndhK* ndhI ndhC ndhB^ ndhF ndhD ndhE ndhG
NADH oxidoreductase	ndhH ndhA*
large subunit ribosomal	rpl33 rpl20 rpl36 rpl14 rpl16 rpl22 rpl2*^
proteins	rpl23* rpl32
small subunit ribosomal	rps16 rps2 rps14 rps4 rps18 rps12 rps11
proteins	rps15 rps8 rps3 rps19 rps7* rps12_3end*
RNA polymerase	rpoA rpoB rpoC2 rpoC1^
other proteins	matK accD cemA clpP infA ccsA

* Two gene copies

^ Gene contains intron

친풍과 연풍의 gene annotation을 바탕으로 고려인삼 친풍과 연풍의 엽록체 genome map을 OGDRAW를 이용하여 작성하였다. 다음 그림 1-17는 친풍과 연풍의 엽록체 지도이다.

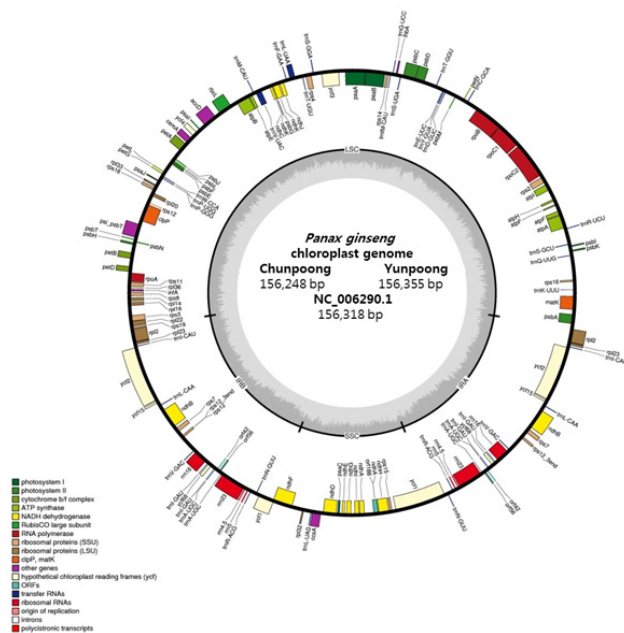


그림 1-17. 유전체 정보의 0.1X coverage를 이용하여 완성된 천풍과 연풍의 chloroplast genome map

(3) 천풍과 연풍 엽록체 유전체의 레퍼런스서열과의 비교분석

완성된 천풍과 연풍의 엽록체 서열을 reference와의 서열 비교를 실시하였다 (그림 1-18). 천풍과 연풍, 레퍼런스의 엽록체 서열 비교 결과, 레퍼런스와 천풍, 연풍은 각각 99.7%, 99.8%의 서열 유사도를 보였으며, 이와 반면에 천풍과 연풍은 약 99%의 서열 일치율을 나타냈다. 천풍과 연풍 엽록체 서열 내에서 rpoC1 exon에서 1개의 SNP, rpl32-trnUAG, ycf1 gene에서 2개의 InDel이 확인되었고 천풍에서 확인된 rpoC1의 SNP와 tandem repeat 반복수로 인한 rpl32-trnUAG의 InDel 1개는 모든 상용 고려인삼 및 화기삼, 전칠삼을 포함한 인삼 종 영역에서 천풍 특이적 서열로 나타났으며, 역시 tandem repeat 반복수의 차이로 발생한 ycf1의 InDel 변이는 고려인삼 9품종에서 천풍만의, 근연종 화기삼만의 특이적 서열로 확인되어 품종 및 종간 식별이 가능한 분자마커로 개발되었다.

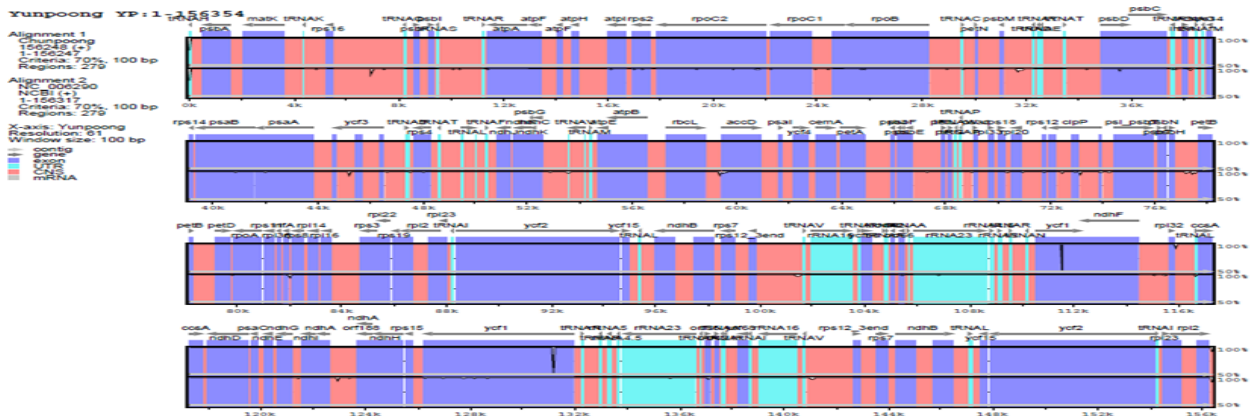


그림 1-18. 천풍, 연풍과 reference 엽록체 genome간의 mVISTA 프로그램을 이용한 비교분석

또한 천풍과 연풍의 엽록체 서열 내에 tandem repeat 분석을 위해 REPuter와 Tandem repeat finder2.0 프로그램을 이용하여 실시하였다 (그림 1-19). 천풍과 연풍간 tandem repeat 차이는 2개로 나타났고, rpl32-trn UAG에서 약 7bp tandem repeat copy 수가 천풍에서 3 copy, 연풍에서 2 copy로 확인되었고, ycf1 gene에서 약 57bp tandem repeat copy 수가 천풍에서 3 copy, 연풍에서 4 copy로 최종 분석되었다.

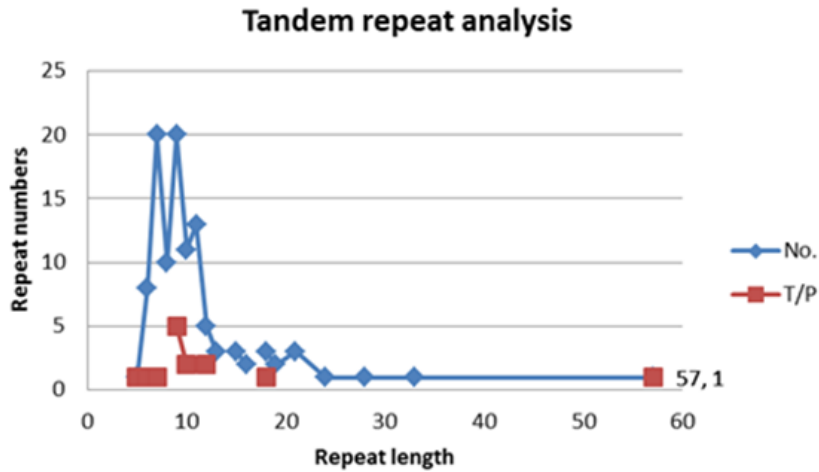


그림 1-19. 천풍 엽록체 서열의 tandem repeat을 REPuter와 Tandem repeat finder2.0 프로그램을 이용하여 분석한 결과

(4) 인삼 상용 품종들의 엽록체서열과 nrDNA 서열 해독

상용품종 중 천풍과 연풍을 제외한 7품종과 재래종 2종 내에서 약 0.1X - 0.3X의 whole genome coverage에 해당하는 randem sample set을 이용하여 어셈블리를 진행하였으며 모든 품종에서 컨티그 3-5개로 레퍼런스 cp genome을 모두 커버하였다 (그림1-20). 또한 평균 텡스는 80X -325X, 서열의 길이는 156,241bp-156,425bp에 이르는 것으로 확인되었다 (표 1-10).

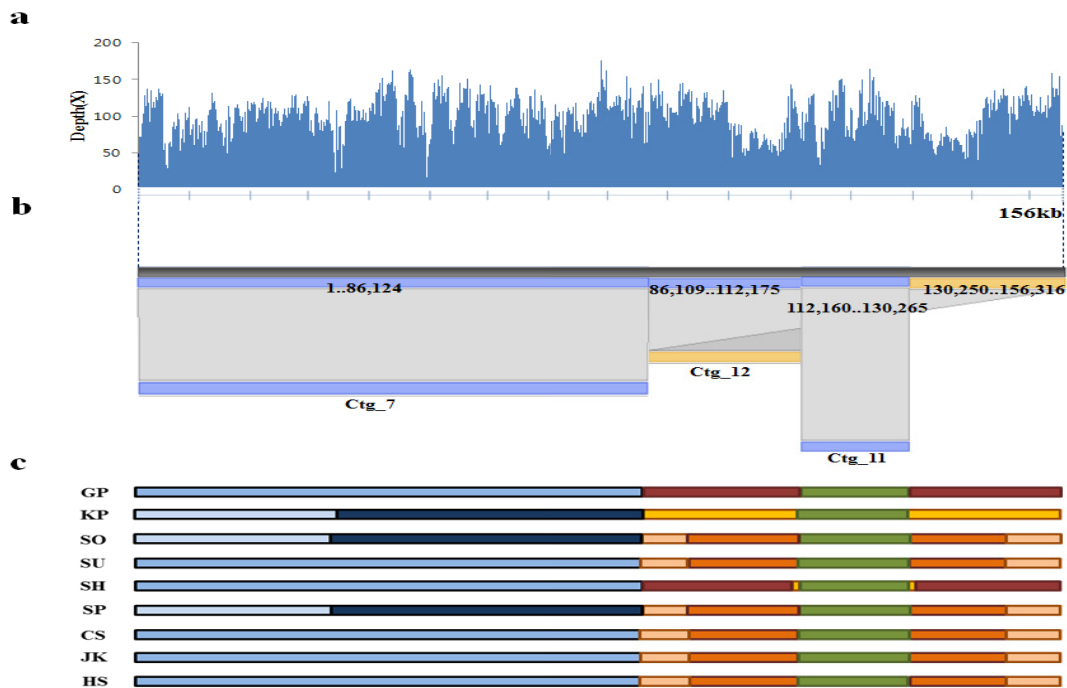


그림1-20. 고려인삼 7품종과 재래종 2종의 어셈블리 결과
a. reads depth b. 레퍼런스 cp genome에 initial contigs 맵핑 결과
c. 9개의 accession의 initial contigs 의 맵핑 모식도

표 1-10. 7개의 인삼 상용품종 및 재래종 2종 시퀀싱 및 어셈블리 결과

Name	Total raw reads no.	Total read bases(bp)	No. of CP contig	CP coverage (x)	45S rDNA coverage(x)	5S rDNA coverage(x)	CP genome length (bp)	45S rDNA length (bp) ¹⁾	5S rDNA length(bp)
Gumpoong (GP)	14,469,452	1,461,414,652	3	80.00	153	1060	156,356	11,067	898
Kopoong (KP)	17,477,870	1,765,264,870	4	325.67	370	1956	156,355	10,095	898
Sunpoong (SP)	17,406,574	1,758,063,974	3	89.04	146	1479	156,355	11,012	898
Sunone (SO)	16,863,306	1,703,193,906	5	153.57	869	2105	156,355	11,089	898
Sunun (SU)	19,081,012	1,927,182,212	4	66.73	463	1020	156,355	11,025	898
Sunhyang (SH)	18,255,214	1,843,776,614	4	96.30	983	977	156,425	10,991	898
Chungsun (CS)	21,757,942	2,197,552,142	4	99.74	293	1240	156,356	10,952	898
Hwangsook (HS)	19,840,654	2,003,906,054	4	267.90	216	1146	156,241	11,070	898
Jakyung (JK)	15,461,684	1,561,630,084	4	91.19	243	647	156,355	10,964	898

고려인삼 9 품종과 재래종 2종의 총 11개의 전체 엽록체 서열을 비교하여 SNP 7, Indel 7개가 확인 되었으며 이들은 각각 품종 특이적 판별 마커로 활용될 수 있음을 확인하였다 (그림 1-21).

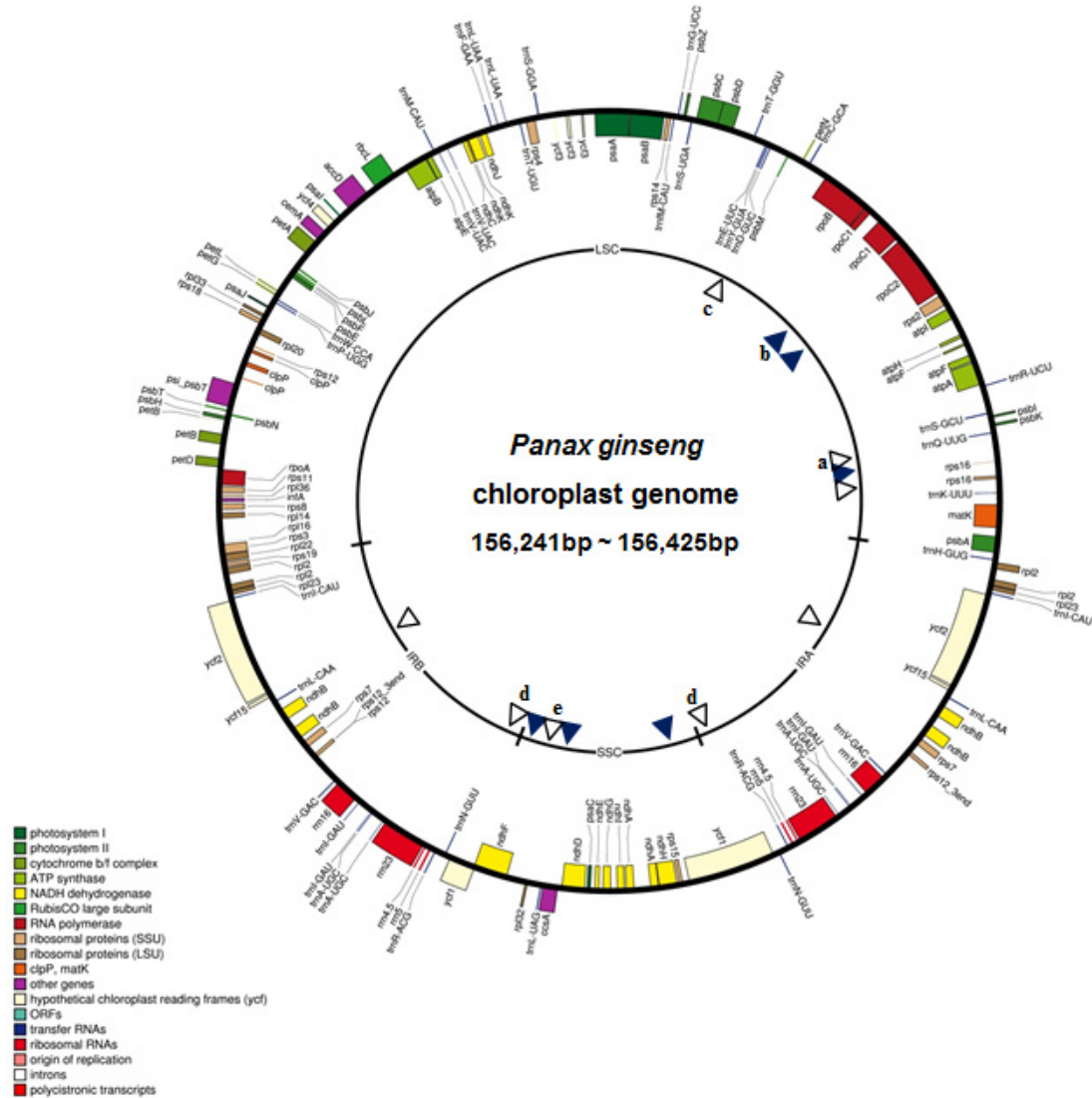


그림 1-21. 인삼 상용 품종(9품종 및 재래종 2종)의 유전자 지도.

11 accessions간의 엽록체 유전체 서열 변이 지역을 Inner circle의 빨간색과 파란색 라인으로 표시함. 빨간색 라인은 품종 내 InDel 변이 표시, 파란색 라인은 품종 내 SNP 변이 표시.

엽록체 유전체는 종 내 변이가 거의 없는 것으로 알려져 있으나, 이번 고려인삼 전 품종의 엽록체 유전체 해독을 수행한 결과, 종 내 다양성도 확인이 되어 엽록체 유전체 해독을 이용한 종 내 변이 연구로 우수 품종의 육성을 위한 바코딩 시스템 기반을 마련하는 계기를 마련하였다.

이와 더불어 11개의 accession들에 대해 45s nrDNA 서열 어셈블리를 진행하였다. 그 결과 한 군데의 N을 포함한 총 길이 11,091bp의 repeat unit 단위를 모두 확인하였고 (그림 1-22), 품종 내 변이를 확인하였다. 그간 nrDNA는 수천카피의 반복으로 인해 명확한 어셈블리가 쉽지 않았으며 또한 개체 내에서도 heterogeneous type이 존재하는 진화적 특징으로 인해 ITS1, ITS2 등 일부 지역에 국한된 연구들이 진행되어 왔었다. 전체 45s nrDNA conserved region의 명확한 어셈블리 완성으로 인해 종 내 뿐 아니라 간의 유전자 단계에서 서열 변이를 확인하는 결과를 나타내었다.

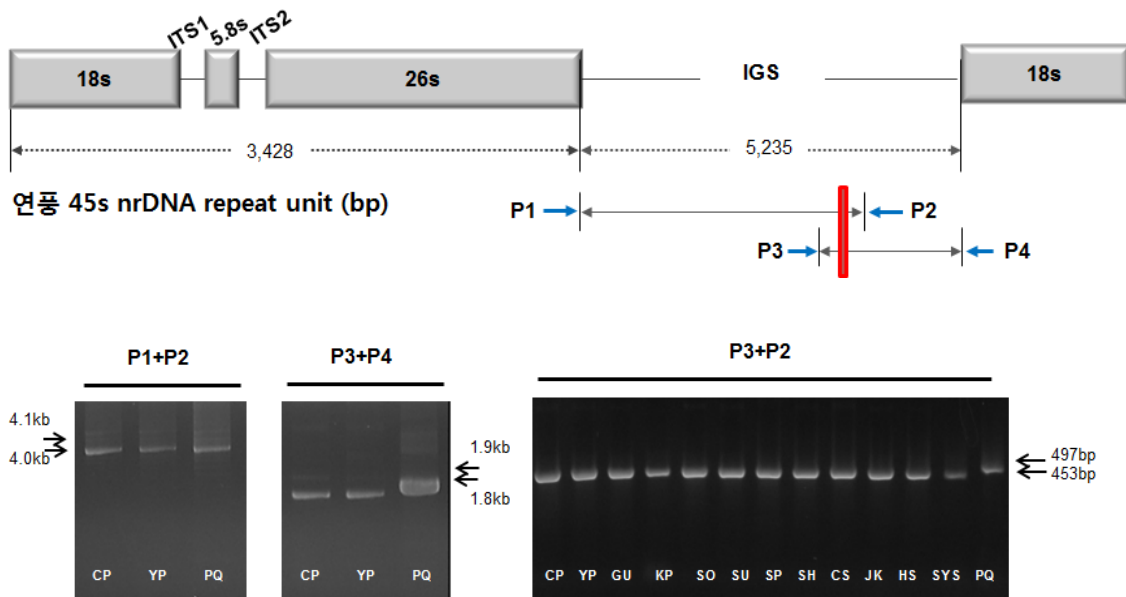


그림 1-22. 연풍의 nrDNA 구조와 화기삼과의 서열변이에 기초한 마커 개발과 적용

라. 엽록체 서열 유래 품종 구분 마커 개발

(1) 천풍과 연풍 엽록체 유전체 서열 변이에 기반하여 개발한 품종 구분 분자 마커

천풍과 연풍의 엽록체 유전체 변이를 기반으로 엽록체 유전자 유래 분자마커를 개발하였다. 두품종간에는 1 SNP(single nucleotide polymorphism), 1개의 tandem repeat copy number의 변이가 확인되었다. 천풍 엽록체 유전체 rpoC1에서 확인된 1 SNP는 천풍 T, 연풍 G로 나타났으며 이의 품종간 식별 분자 마커 개발을 위해 dCAPS primer를 제작하였으며 (그림 1-23a, b) 다음과 같은 결과를 얻었다 (그림 1-23c). 천풍에서 확인된 SNP를 9 품종 및 재래종인 황숙과 자경 그리고 근연종인 미국삼과 중국삼에 함께 적용하였다.

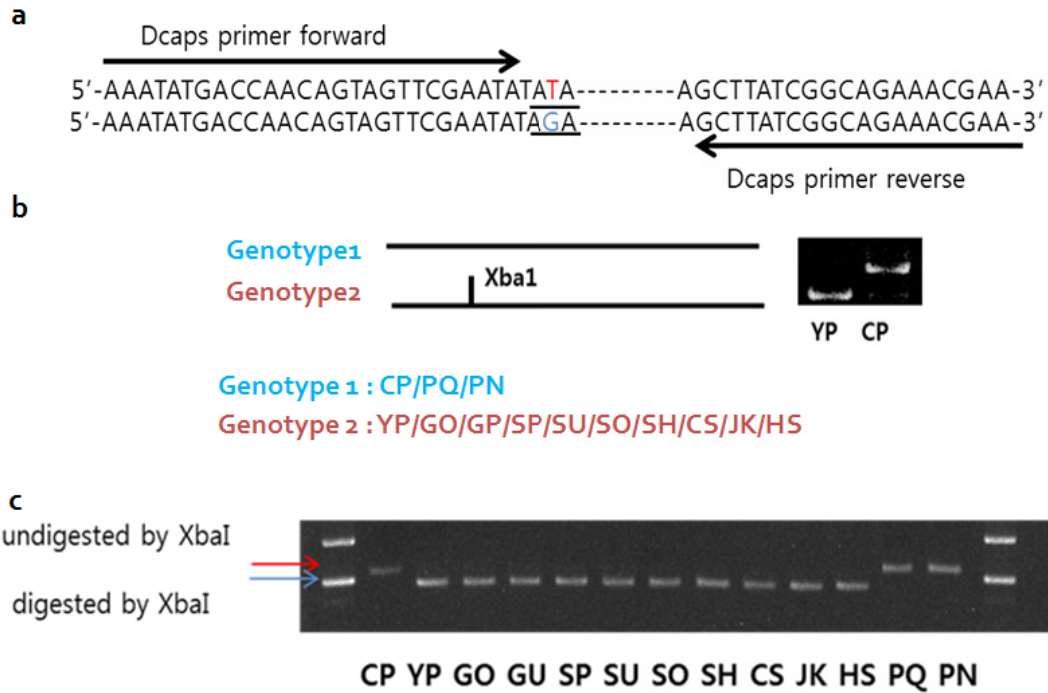


그림 1-23. 천풍, 연풍 엽록체 SNP 변이에 기반하여 개발된 dCAPS01 분자 마커. a. 천풍, 연풍 엽록체 유전자 rpoC1 서열에 기반하여 dCAPS 프라이머 디자인 b. rpoC1 유전자의 SNP에 의한 고려인삼 품종간 유전자형 분석 c. 고려인삼 9품종과 자경, 황숙의 재래종, 화기삼, 전철삼을 대상으로 dCAPS01 프라이머 적용

그 결과 고려인삼 중 내에서 천풍 특이적 염기서열 변이로 나타나 천풍 품종을 식별하는 분자마커로 이용이 가능함을 확인하였다. 한편 중국삼, 미국삼은 천풍과 같은 genotype을 가지는 것으로 확인되었다.

천풍과 연풍의 rpl32-trnUAG intergenic region에서 7bp tandem repeat copy number의 변이가 확인되어 flanking region에서 프라이머를 디자인하였고(pgcp139f*r2), 이를 고려인삼 9개 품종 및 재래종과 화기삼, 전철삼에 적용하였다. 그 결과 천풍을 제외한 모든 파낙스 중에서 같은 genotype이 확인되어 본 개발된 마커는 천풍 특이적 마커로 확인되었다 (그림 1-24).

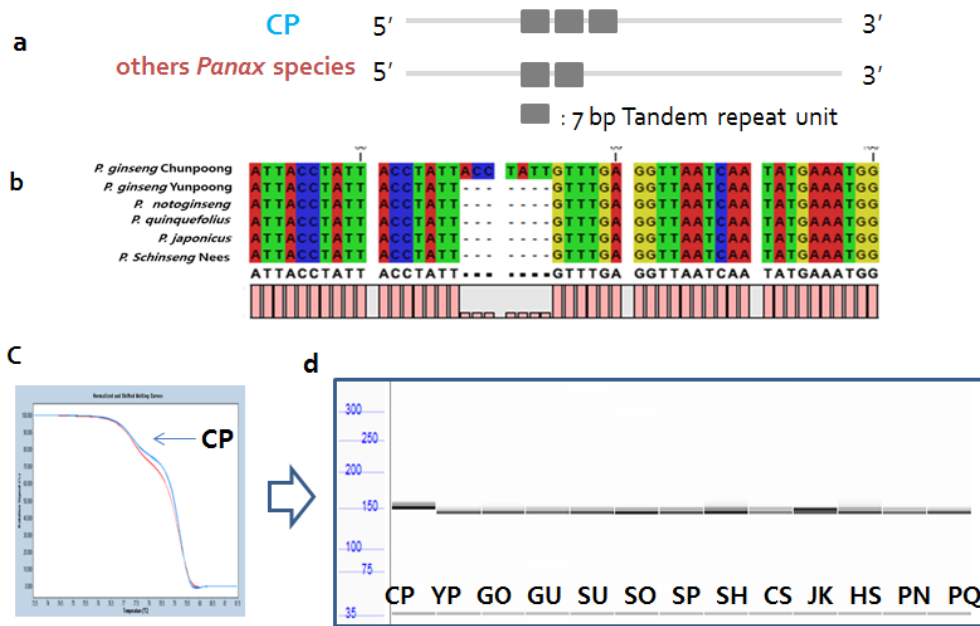
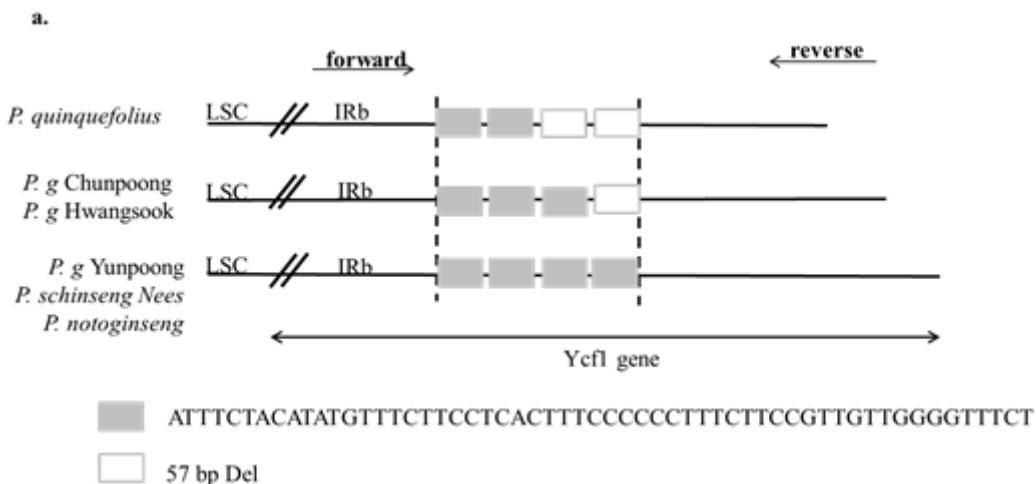


그림 1-24. pgcp139f*r2 천풍 특이적 분자 마커 개발 a. 7 bp tandem repeat 반복수 차이에 따른 천풍과 다른 인삼종과의 변이 차이 b. 품종 간 7 bp 반복서열 c. high resolution melting 분석에 따른 천풍과 연풍의 서열 변이 d. pgcp139f*r2의 9품종과 2 재래종, 전칠삼, 화기삼에 적용 결과

(2) 엽록체 서열 해독에 기반한 미국삼 판별 분자 마커 개발

천풍과 연풍의 엽록체 염기서열 변이에서 유래되어 개발된 pgycf1 primer set의 파낙스속 인삼 종들에 적용하였다. ycf1 gene 내에서 천풍과 연풍간 57bp tandem repeat unit의 변화가 확인되었다. 천풍에서 3 copy, 연풍에서 4 copy로 나타났으며 (그림 1-25a), 전체 고려인삼 9품종 및 재래종 2종과 미국삼, 중국삼으로의 확대 적용 결과 재래종의 황숙이 천풍과 같은 genotype으로 분류되고 미국삼이 2 copy로 분류되며 나머지 고려인삼 품종들(연풍, 선풍, 선운, 선원, 선향, 금풍, 고평, 청선)과 중국삼이 같은 genotype로 확인되었다 (그림 1-25b). 최종적으로 pgycf1 primer set은 미국삼 특이적 분자마커로 확인되었다.



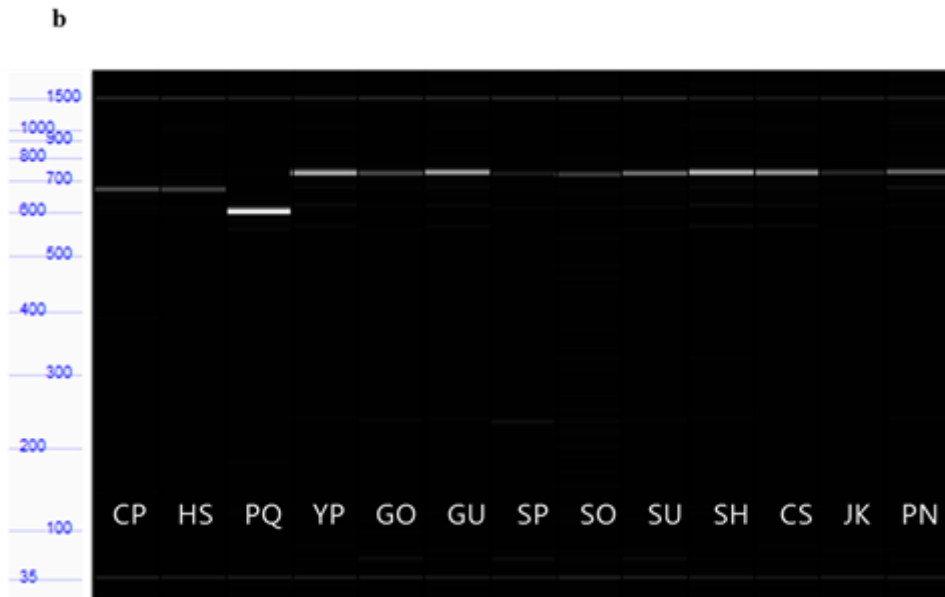


그림 1-25. 천풍, 연풍 엽록체 유전체 *ycf1* 유전자 내 57 bp 반복서열 변이에 기반하여 개발된 분자 마커 a. 고려인삼 품종 간, 인삼 중 간 *ycf1* 유전자 내 57 bp 반복 서열 변이 b. 고려인삼 9 품종과 2 재래종, 화기삼, 전칠삼을 대상으로 57 bp 반복 서열 변이에 기반하여 개발된 *pgycf1* 프라이머 세트의 적용 결과

(3) 엽록체 기반 분자마커의 품종 간 및 종 간 식별 검정

천풍과 연풍의 엽록체 서열 변이에 기반하여 모두 3개의 분자 마커를 개발하였는데 (표 1-11), *pgycf1* 프라이머 세트와 *pgcpd01* 프라이머 세트의 조합 적용으로 천풍의 식별이 가능하다. 또한 *pgcp139f*r2* 프라이머는 모든 인삼 중에서 천풍을 식별할 수 있으며 *pgycf1* 프라이머는 미국삼 식별 특이 마커가 된다.

표 1-11. 엽록체 유래 DNA 분자 마커 정보

Primer ID	Primer sequence(5'-3')	Location
Pgcpd01	F : AAATATGACCAACAGTAGTTCGAATCTA	rpoC1 exon
	R : AGCTTATCGGCAGAAACGAA	
Pgcp139f*r2	F : TGTGCGACAAACAAATAAGTCA	rpl32-trnUAA intergenic spacer
	R2 : CGAAGCGAGTTCATTTCAT	
Pgycf1	F : GGTATTAGTCTGGATACGGCAAA	<i>ycf1</i> gene in both inverted repeat region
	R : TCGAAAAGAAGGGTCACAAGA	

위와 같이 확인된 고려인삼 중 내 (품종 간) 및 종 간의 엽록체 유전체 염기서열의 변이를 품종 고유의 분자마커 개발을 위해 전체 71개체의 고려인삼 품종 및 미국삼, 중국삼에 최종 blind test를 수행하였다. 수행 결과, *pgcp139f*r2*는 모든 과낙스 중에서 천풍을 판별할 수 있는 천풍 특이적 마커로 확인되었으며 이는 천풍의 품종 보호 및 품종 선별, 우수 품종 육성에 이용될 수 있다 (그림 1-26). 또한 *pgycf1* primer set은 미국삼(화기삼)을 판별할 수 있는 화기삼 특이 마커로 나타났으며 (그림 1-27), 이는 수삼 및 다양한 인삼가공제품에서 고려인삼과 화기

삼의 혼입 등을 판별하는 인삼 종 간 식별 분자마커로 이용될 수 있다.

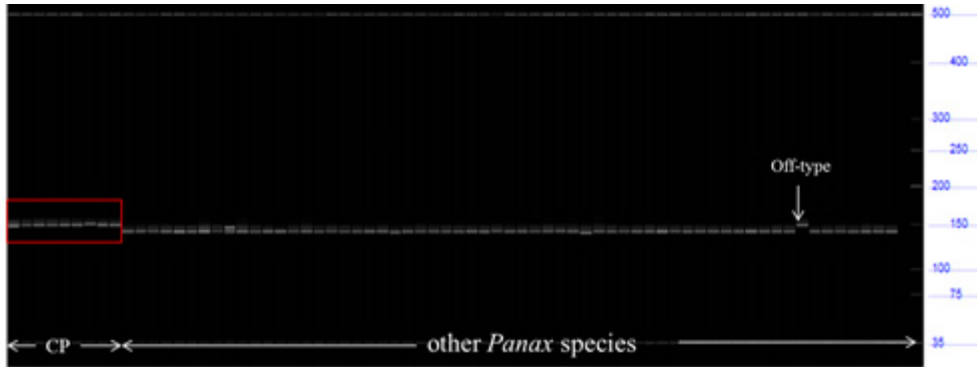


그림 1-26. 천풍 특이적 primer set pgcpir139f*r2의 78개체에 blind test 적용 결과

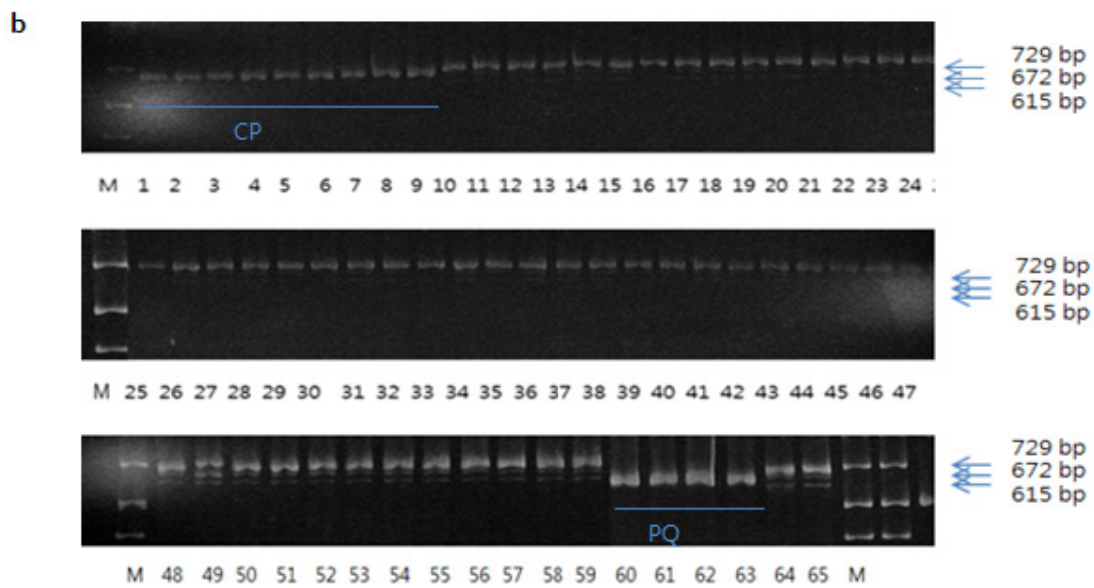


그림 1-27. 고려인삼 종 내 및 파낙스속(인삼속) 종 간의 변이를 확인한 primer set pgcpycf1의 65개체에 blind test로 적용한 결과

(4) 엽록체 서열 변이 기반 전칠삼 특이 마커의 개발

고려인삼으로 만들어진 제품들은 인삼가공제품에서 가장 탁월한 효능을 인정받으며 인삼가공 제품시장을 선두 지휘하고 있다. 따라서 고가에 거래되며 고려인삼의 명맥을 이어 가고 있다. 저가의 인삼들이 혼입 유통되는 것은 고려인삼의 가치를 희석시킬 뿐 아니라 국가 경제에 큰 손해를 줄 수 있다. 특히, 전칠삼은 화기삼보다 더욱 저가로 국제시장에서 거래되고 있어 혼입의 우려가 커지고 있다. 전칠삼은 수삼의 형태로는 외형상 선별이 가능하지만(그림 1-28), 가공제품의 특성상 원형을 찾을 수 없기 때문에 현재로서는 정확한 분자마커만이 이를 판별할 수 있다.



그림 1-28. 파낙스속 3종 고려인삼, 미국삼, 중국삼의 사진

따라서 본 연구에서는 전칠삼 특이적인 3종의 분자마커를 개발하였는데 이는 고려인삼과 전칠삼의 엽록체 서열의 Indel 변이에 기반하여 제작되었다 (그림 1-29). 3종의 분자마커는 고려인삼과 전칠삼의 co-dominant 마커로 수삼 및 모든 인삼 가공제품에서 전칠삼을 판별해 낼 수 있다.

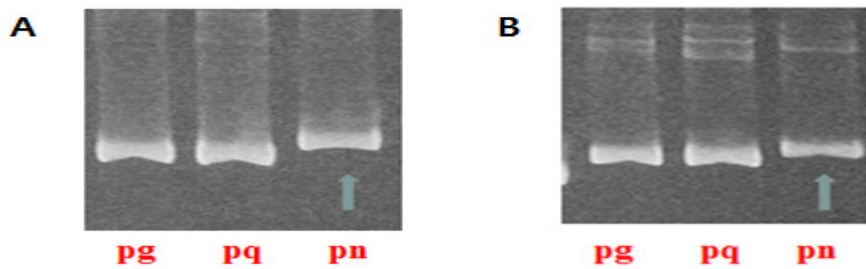


그림 1-29. 전칠삼 특이 마커 중 일부. (a) pgcpir107, (b)pgcpir108. pg, *panax ginseng*; pq, *panax quinquefolius*; pn, *panax notoginseng*.

추가 확인된 전칠삼 식별 가능한 잠재적 분자마커 pgcpir045, 096, 098, 106, 123 primer set의 적용 결과이다 (그림 1-30).

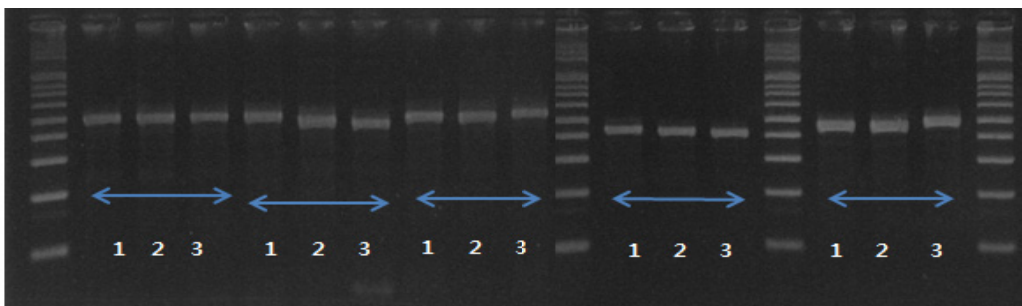


그림 1-30. 고려인삼과 미국삼, 중국삼의 종 구분 식별을 위한 잠재적 co-dominant marker인 pgcpir045, 096, 098, 106, 123 primer set 적용 결과, no. 1 고려인삼, 2 미국삼(화기삼), 3 중국삼(전칠삼)

국가 경제적 이익과 함께 국제시장에서 고려인삼의 지위를 지키기 위해 더욱 다양한 분자마커의 개발이 있어야 할 것이며 다양한 접근의 시도 및 연구가 이뤄져야 하겠다.

다. 종구분 마커를 활용한 상용 인삼 가공 제품의 기원 및 재료 혼입 판별의 실용화

고대로부터 인삼은 뛰어난 약리작용으로 인해 신비의 명약으로 알려져 있다. 현재, 인삼은 고려인삼을 비롯하여 아시아의 전칠삼, 죽절삼, 북미의 화기삼 등 약 15종이 파낙스속으로 분류, 등재되어 있다. 이중 고려인삼은 사포닌의 종류, 함량 및 다양한 약리작용으로 뛰어난 효능을 인정받고 있으며 그 결과 국제시장에서 고가의 시세를 형성 거래되고 있다. 특히 고려인삼의 홍삼은 최고로 인정받고 있다. 인삼은 다양한 형태로 유통되고 있다. 현재 시중에는 수삼 뿐 아니라 다양한 형태의 인삼가공제품들이 제조 판매되고 있으며 이들은 모두 고려인삼 100%를 표방하고 있다. 하지만 가공제품은 제조과정의 특성상 다양한 형태 변화를 겪으며 그의 원산지를 판별하기가 쉽지 않아 진다. 이러한 요인들로 인해, 특히 가공제품에서, 고려인삼에 비해 상대적으로 저가인 북미의 화기삼과 전칠삼 등의 혼입이 우려되고 있어 인삼가공제품의 원산지를 신속 정확하게 판별할 수 있는 다양한 분자마커의 개발과 현재 개발이 완료된 분자마커의 적용으로 인삼가공제품에서 인삼의 원산지를 판별하는 시스템의 상용화가 요구되어 진다.

(1) 인삼 가공제품 (건삼, 홍삼, 인삼 분말, 액기스)을 대상으로 한 재료 혼입 판별

인삼가공제품에는 가루, 환, 절편, 정과, 건삼, 농축 액기스, 음료수, 차 등 다양한 형태로 만들어 지고 있다 (그림 1-31). 이러한 가공제품에서 DNA를 추출하기 위한 다양한 방법이 개발되었으며 또한 인삼가공제품에서 DNA 추출의 어려움을 극복하고자 개발된 nested PCR이 기술적으로 상용화할 수 있는 단계에 왔다. nested PCR 이란 1차 생산된 PCR product를 template으로 사용하여 2차 PCR을 하는 기법으로 가공제품의 기원지를 판별하는 분자마커 개발의 핵심적 기술이다. 현재 이 기술은 기술개발이 완료되어 상용화 단계에 있다. 또한 이와 동시에, 다양한 형태의 가공제품에서 인삼 DNA의 추출이 더욱 효율적인 방법으로 개선되어 기존 개발된 종 구분 분자마커의 직접(1차) 적용도 가능해졌으며 모든 형태의 인삼가공제품에서 인삼의 원산지를 신속 정확하게 판별할 수 있게 되었다.



그림 1-31. 시중에 유통되고 있는 인삼가공제품의 다양한 형태

1, 2차년도 연구로 개발된 인삼의 원산지 판별 분자마커로는 고려인삼 중 특이적 우성 마커와 화기삼 중 특이적 우성 마커, 고려인삼과 화기삼의 co-dominant 마커가 있으며 이들은 인삼 종에 따른 인삼 엽록체의 서열상의 변이를 기반으로 제작된 것으로 고려인삼과 화기삼의 두 종류의 인삼이 혼합되어 있을 경우 각각 인삼의 1%의 함량까지도 판별 가능 하며 어떠한 형태의 가공제품에서도 모두 원산지를 판별할 수 있는 분자마커이다.

이러한 분자마커들을 이용하여 시중에 유통되고 있는 가공제품 중에 화기삼의 혼입 여부를

조사하였다. 시료는 2011 금산 세계 엑스포에서 홍삼 분말 및 엑기스 9종을 임의로 구입하였고 (그림 1-32, 표 1-12), 1, 2차년도에 개발한 DNA 추출법을 이용하여 실험을 진행하였다.



그림 1-32. 화기삼 혼입여부 확인 실험에 사용된 시료들 중 일부

표 1-12. 사용된 홍삼 가공제품들

No.	제품 목록	구입 시기	구입 장소
1	금홍영* 엑기스	2011.09	금산 인삼엑스포
2	정** 엑기스	2011.09	금산 인삼엑스포
3	천** 엑기스	2011.09	금산 인삼엑스포
4	흑홍** 엑기스	2011.09	금산 인삼엑스포
5	덕*** 엑기스	2011.09	금산 인삼엑스포
6	정** 농축액	2011.08	대리점
7	홍삼 엑기스	2011.09	금산 인삼 시장
8	천** 분말	2010.10	금산 인삼 시장
9	한** 분말	2010.10	금산 인삼 시장

제품에 화기삼의 혼입 여부를 확인하기 위하여 개발된 마커 중 화기삼 특이 우성 마커를 적용하였다. 우성 마커는 한 번의 PCR과 한 번의 전기영동으로 신속하게 결과를 확인할 수 있는데 본 실험에 적용된 dominant 마커는 화기삼만을 증폭시킬 수 있다 (그림 1-33). 전기영동 결과 9개의 제품중에 화기삼이 혼입된 제품은 보이지 않았다 (그림 1-34).

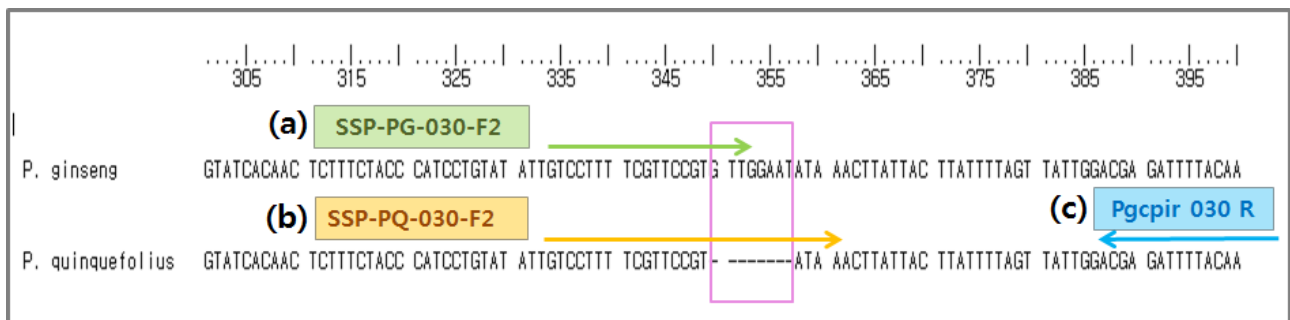


그림 1-33. 고려인삼과 화기삼의 특이적 판별 dominant DNA 마커 조합

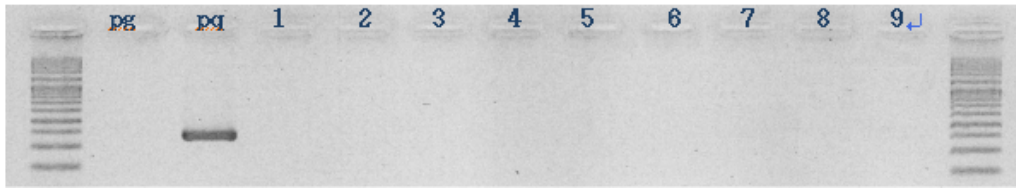


그림 1-34. 시중 유통되고 있는 인삼가공제품의 SSP-PQ-030 F2 dominant marker 적용 결과

(2) 엽록체 유래 분자마커를 이용한 해외 시판 제품내의 인삼의 기원지 판별

천풍 엽록체 유전체 염기서열 변이에 기반하여 개발된 위 분자마커들을 인삼가공제품에 적용해 보았다. 중국산 16종의 인삼가공제품은 모두 고려인삼과 화기삼을 표방하고 있으며 고려인삼의 구체적 품종이 명시되어 있지 않은 제품들이다. 중국산 인삼가공제품의 인삼의 기원을 판별하기 위해 2차년도, 3차년도에 개발되었던 인삼가공제품에서 DNA 추출법을 사용하여 DNA를 추출하였으며 direct로 PCR을 수행하였다. 본 그림 1-35, 표 1-13은 16종의 중국산 샘플의 사진과 목록들이다.



그림 1-35. 16종의 중국산 인삼가공제품의 사진

번호	상호	제조사	비고
1	Korea Insam	N.K	고려인삼
2	길림삼편	집안시 길림성 유한공사	서양삼편
3	인삼편	길림성블로임특산자원유한공사	길림인삼
4	서양삼편	길림성블로임특산자원유한공사	서양삼편
5	서양삼편	Jilin Province RongZe Ginseng industry & Trade Co.,Ltd	서양삼편
6	장백산 승링	Jilin Province RongZe Ginseng industry & Trade Co.,Ltd	장백산 인삼
7	서양삼편	장백산 인삼기지 중심	서양삼
8	서양삼	장백산 서양삼	꽃
9	인삼화	장백산 인삼	꽃
10	인삼화	장백산 인삼	꽃
11	화기서양삼	중국.길림장백산인삼기지	서양삼편
12	서양삼	장백산서양삼	서양삼
13	서양삼	Ginseng of Wisconsin America	미국
14	화기서양삼	중국.길림장백산인삼기지	서양삼 작은 것
15	서양삼차	화선당	서양삼
16	서양삼분	화선당	서양삼

표 1-13. 16종의 중국산 인삼가공제품 샘플의 목록

천풍 엽록체 유전체 염기서열 변이로 확인된 rpl32-trnUAG intergenic region을 기반으로 개발된 pgcpir139f*r2의 중국산 인삼가공제품에 적용 결과 모두 동일한 타입으로 나타났으며 천풍은 아닌 것으로 확인되었다 (그림 1-36). 천풍은 품종 등록이 된 고려인삼 대표 품종으로 계약재배 등의 형태로 보급, 재배되고 있어 중국으로의 유입은 아직 나타나지 않은 것으로 보인다.

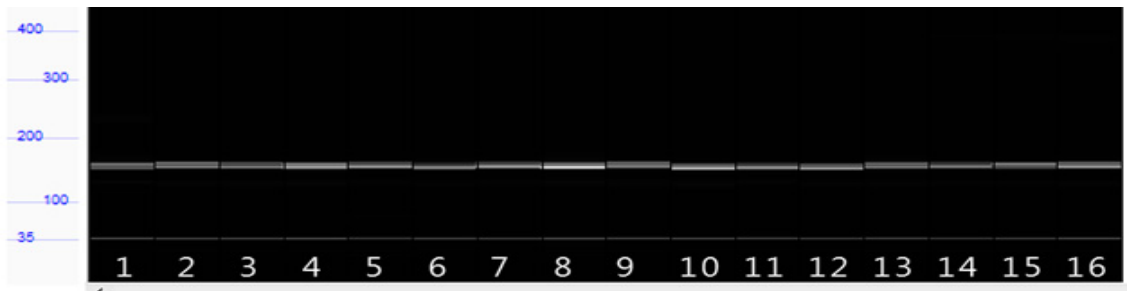


그림 1-36. 천풍 엽록체 유전체 염기서열 변이로 개발된 천풍 특이적 primer set pgcpir139f*r2의 중국산 인삼가공제품 16종에 적용 결과

고려인삼 종 내 및 파낙스속에서 종 간의 변이가 확인된 엽록체 유전체 ycf1 gene 내의 57bp tandem repeat unit의 변이를 확인하는 pgcpcyf1 primer set을 중국산 인삼가공제품 16종에 적용 결과 (그림 1-37), 16종 모두 고려인삼 100%, 화기삼 100%를 표시하고 있었지만 본 실험 결과 일부 제품에서는 고려인삼과 화기삼의 혼입도 발견이 되었다. 이의 정확한 인삼의 기원이 판별되기 위해서는 더 많은 분자마커의 개발과 마커간의 조합 적용이 필요할 것으로 보인다.

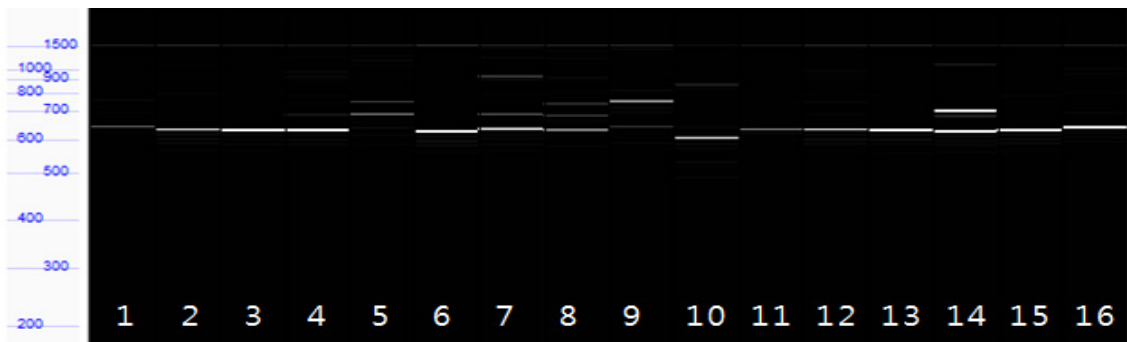


그림 1-37. 파낙스속 종 내 및 종 간의 변이를 기반으로 개발된 pgcyf1 primer set의 중국산 인삼가공제품 16종에 적용한 결과

바. 오가과 약용식물 자원의 성분 및 DNA 마커 활용 분류체계 정립

인삼, 오가피, 두릅을 비롯하여 오가과 및 산형과의 많은 식물들은 우수한 약리 성분과 효능으로 약용 및 건강기능식품으로 애용되고 있다. 약용식물은 재배환경과 생육조건에 따라 성분과 함량의 차이가 크게 생기며 이는 약효에도 큰 영향을 미친다. 따라서 거래 시세도 큰 차이가 난다. 시장에서는 대부분 형태적 분류만으로는 그의 원산지와 종 및 품종을 판별하고 있다. 하지만 약재는 대부분 건조된 형태로 유통되고 있으며 이를 외형적 기준만으로 원산지를 판별하기는 더욱 어렵다. 또한 의도적으로 저가의 중국산 약재를 국산으로 속이거나 혼입 유통시키는 경우, 품종간 명확한 구분 없이 저가의 약재들을 대체 유통시키는 경우 이의 원산지를 판별해 내기란 더욱 어려운 실정이다. 따라서 약용식물에 대한 유전체적 연구의 접근은 약재의 기원종을 판별하고 명확한 품종 구분 시스템을 구축하여 자원의 유전적 다양성을 보호하고 투명한 유통시장의 구현을 위해 먼저 선행되어야 할 연구이다. 또한 이는 약용식물의 우수 품종 개발과 육성을 위한 연구의 기반이 될 것이며, 오가과 및 산형과 약용식물의 유연관계를 확립함

으로써 주요 약용식물들의 근연관계를 밝히는 유전체적 초석이 될 수 있을 것이다.

(1) 오가피속 약용식물 자원 수집 및 인삼 마커를 이용한 판별용 마커 개발

오가과 및 산형과 약용식물의 유전적 다양성과 우수 품종 육성을 위해 수집 확보된 식물 자원으로 수신오가피(충남 천안시 위치) 농장, 서울대학교 수원 수목원, 서울대학교 약초원, 동경상사, 서울대학교 수원농장 등에서 수집되었다 (표 1-14).

표 1-14. 수집된 오가과 및 산형과 약용식물

번호	이름	번호	이름	번호	이름	번호	이름
01	고려인삼	11	중부오가피	21	일당귀	31	토천궁
02	화기삼	12	음나무	22	참당귀	32	회향
03	전철삼	13	두릅	23	백지	33	고본
04	죽절삼	14	독활	24	사천백지	34	개발나물
05	오가피혼합종a	15	오가피	25	사상자	35	기름나물
06	오가피혼합종b	16	민가시오가피	26	갯사상자	36	강활
07	흰털오가피순종	17	지리강활	27	섬시호	37	갯강활
08	흰털오가피	18	해방풍	28	개시호	38	산양삼
09	가시오가피	19	식방풍	29	삼개시호		
10	섬오가피	20	원방풍	30	일천궁		

확보된 식물자원 중 23종을 적용하여 오가과 및 산형과 약용식물의 분자마커 개발을 시도하였다. 오가피속 식물의 유연관계 정립에 적용되었던, 먼저, 인삼에서 개발된 마커 중 임의로 17종(pgcpir10, gcpir11, pgcpir12, pgcpir31, pgcpir35, pgcpir36, pgcpir37, pgcpir43, pgcpir45, pgcpir47, pgcpir48, pgcpir53, pgcpir54, pgcpir60, pgcpir64, pgcpir73, pgcpir85)을 선발해 위의 23종 약용식물에 적용하였으며 적용된 산형목 약용식물 23종은 표 1-15과 같다 (그림 1-38). 선발된 마커로 PCR을 수행하여 6% mini-PAGE로 각각의 다형성을 측정하였다.

표 1-15. 분석에 사용된 산형목 약용식물들

번호	이름	번호	이름	번호	이름	번호	이름
01	고려인삼	07	흰털오가피(순종)	13	두릅	19	백지
02	화기삼	08	흰털오가피	14	독활	20	사상자
03	오가피	09	가시오가피	15	강활	21	시호
04	민가시오가피	10	섬오가피	16	해방풍	22	식방풍
05	오가피혼합종(A)	11	중부오가피	17	당귀	23	천궁
06	오가피혼합종(B)	12	음나무	18	방풍	24	-

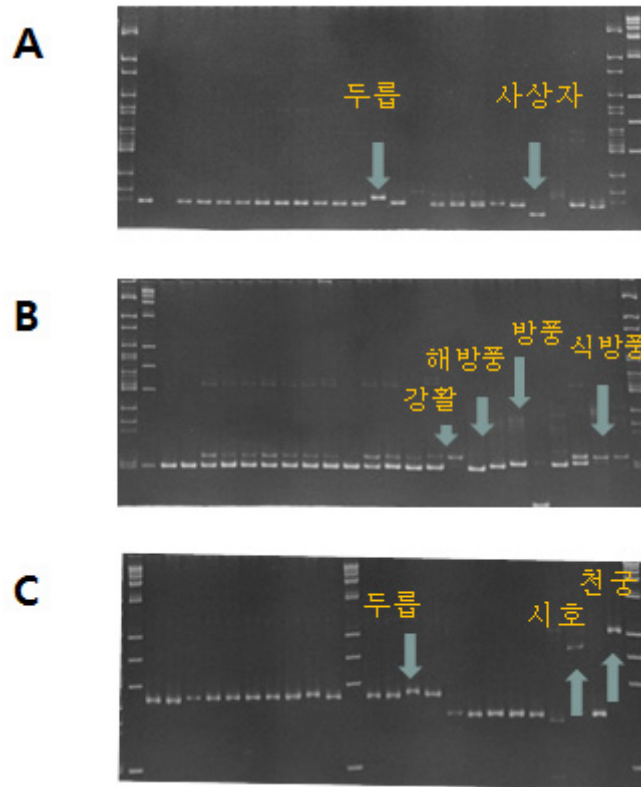


그림 1-38. 오가과 및 산형과 약용식물의 종 특이적 마커 중 일부.
 (A) pgcpir54, (B) pgcpir64, (C) pgcpir85

실험 결과 각각의 마커당 대립형질의 수는 6-14로 나타났고 적용된 17종의 마커 중 pgcpir12와 pgcpir47이 가장 많은 대립형질을 생성하는 것으로 나타났다. 또한 이들 마커 중 종 특이적 분자마커를 확인할 수 있었으며 이는 원산지와 품종이 혼재된 약재시장에서 기원지를 판별하고 특정 품종을 판별하는데 이용될 수 있을 것이다. 향후 더욱 많은 마커로 오가과 및 산형과 약용식물을 대상으로 종 특이적 분자마커의 개발이 이뤄져야 할 것이며 다수의 분자마커 개발은 약용식물의 우수 품종 육성에 기반이 될 것이다.

(2) 오가과 식물들에 대한 분류체계 및 유연관계 분석

오가과 및 산형과 약용식물의 분류체계를 구축하기 위하여 위에서 확인된 종 특이적 마커를 정리하였다 (표 1-16). 총 8개의 종의 특이적인 마커를 확인할 수 있었는데, 천궁의 경우 4개의 마커에서 특이적인 밴드를 확인할 수 있었다.

표 1-16. 오가과 및 산형과 약용식물의 분류를 위한 종 특이적인 마커 정보

작물	마커종류	프라이머 정보	
사상자	pgcpir43	F:TCCAGGACTTCGAAAGGGTA	R:ACACGATACCAAGGCAAACC
	pgcpir64	F:TGTCAGCAATAGTATCCCTACCC	R:CCCGGAATTGAGACAGTTA
	pgcpir54	F:TTCTTGCGTGTACCGATTGA	R:AAAGAGGAGTGAATGCTTTCTTTT
시호	pgcpir48	F:GGCCCAAAGAAACGAAAGA	R:GGCCTGGTTGTAGCATTAGC
	pgcpir53	F:AACCACTCAGCCATCTCTCC	R:GCTAATTGGAAAGCAAGAGTCA
방풍	pgcpir53	F:AACCACTCAGCCATCTCTCC	R:GCTAATTGGAAAGCAAGAGTCA

작물	마커종류	프라이머 정보	
해방풍	pgcpir85	F:TTGGAGACCCACGTTCTACC	R:CGGGTTCAAATCCTGTCATC
	pgcpir12	F:AATCCACTGCCTTGATCCAC	R:TGCTGTCGAAGCTCCATCTA
	pgcpir53	F:AACCACTCAGCCATCTCTCC	R:GCTAATTGGAAAGCAAGAGTCA
식방풍	pgcpir85	F:TTGGAGACCCACGTTCTACC	R:CGGGTTCAAATCCTGTCATC
	pgcpir12	F:AATCCACTGCCTTGATCCAC	R:TGCTGTCGAAGCTCCATCTA
	pgcpir53	F:AACCACTCAGCCATCTCTCC	R:GCTAATTGGAAAGCAAGAGTCA
천궁	pgcpir85	F:TTGGAGACCCACGTTCTACC	R:CGGGTTCAAATCCTGTCATC
	pgcpir12	F:AATCCACTGCCTTGATCCAC	R:TGCTGTCGAAGCTCCATCTA
	pgcpir53	F:AACCACTCAGCCATCTCTCC	R:GCTAATTGGAAAGCAAGAGTCA
	pgcpir54	F:TTCTTGCGTGTACCGATTGA	R:AAAGAGGAGTGAATGCTTTCTTTT
두릅	pgcpir11	F:TGTC AATACCGCAACAATG	R:TGGTGACACGAGGATTTTCA
	pgcpir36	F:CGCTTTCGCGTCTCTCTAAA	R:ATCCGACTAGTTCCGGGTTC
	pgcpir54	F:TTCTTGCGTGTACCGATTGA	R:AAAGAGGAGTGAATGCTTTCTTTT
강활	pgcpir64	F:TGTCAGCAATAGTATCCCTACCC	R:CCCGGAATTGAGACAGTTA
	pgcpir85	F:TTGGAGACCCACGTTCTACC	R:CGGGTTCAAATCCTGTCATC

나머지 15종의 식물에 대해서는 특이적인 마커 조합을 찾지 못하였지만, 마커의 조합으로 충분히 구별할 수 있는 시스템을 갖췄으며, 신속한 판별을 위해 다양한 마커 타입을 적용하여 각각의 종에 대해 특이적인 마커를 지속적으로 수행할 예정이다

또한 분석한 오가과 및 산형과의 근연관계를 분석하기 위해 마커 17종에 대한 유전자형을 genotype하여 NTSYS-pc 프로그램을 이용하여 UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) 방법으로 계통수를 그렸다. 계통수는 크게 두 그룹으로 오가과 14종의 샘플과 산형과 9종의 샘플이 나뉘짐을 알 수 있었다 (그림 1-39).

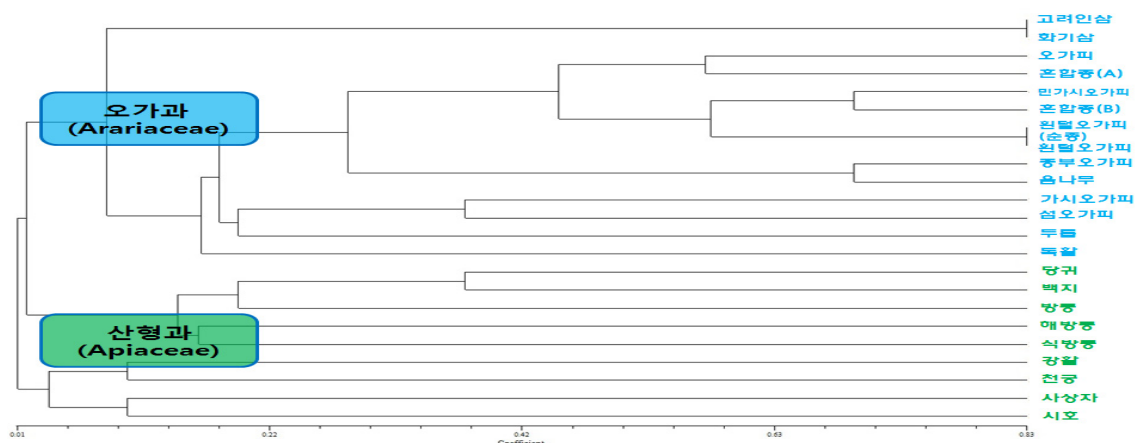


그림 1-39. 분석된 오가과 및 산형과 23종의 유연관계

(3) 민가시오가피의 엽록체 완전 해독 및 비교 분석을 통한 마커 개발

인삼속의 근연종인 오가과 약용식물의 엽록체 유전체 연구를 위해 오가과의 대표적 약용식물인 오갈피나무의 엽록체 유전체 완전 해독과 오가과속 model plant를 수립하기 위해 우리나라 자생종으로 알려진 민가시오갈피를 선정, sequencing을 수행하였다. 민가시오가피의 genome을 NGS의 Illumina HiSeq-2000로 전체 genome size의 약 0.5 - 1X의 raw data를 생산하였다.

생산된 raw read 들은 filtering 과정을 거친 후, 최종적으로 12백만 reads와 1,180백만 base의 서열정보를 생산하였다 (표 1-17).

표 1-17. 민가시오갈피의 NGS sequencing statistics summary

Plant species	raw data		trimmed data			
	read number	read length	read number		read length	
민가시오갈피	19,032,106	1,922,242,706	17,512,501	92.02%	1,697,866,928	88.33%

생산한 서열들로 엽록체 유전체를 어셈블리 하고 유전체 annotation 한 결과는 표 1-18, 그림 1-40 와 같다. 민가시오갈피의 전체 데이터에서 일정량의 random sample set를 추출하여 de novo assembly를 진행하였다. 초기 어셈블리 파일에서 3개의 컨티그가 레퍼런스인 가시오갈피 엽록체 지놈에 완전 매치됨을 보였고 이를 gap-filling을 통해 하나의 완전한 서열을 완성하였으며 draft cp genome 서열은 N, gap 등의 발생 없이, 약 58.72X의 엽록체 지놈 coverage, 엽록체 유전체 서열 156,730bp, 45s nrDNA는 1개의 N을 포함하여 약 10,064bp의 서열을 완성하였다.

표 1-18. 민가시오갈피 엽록체 유전체 어셈블리 결과

	Raw data read no.	Total reads	Mapped reads no.	Chloroplast coverage (x)	Chloroplast genome length (bp)	45s nrDNA 1 unit (bp)
민가시오갈피	4,643,630	469,006,630	95,872	58.72	156,730	10,064



그림 1-40. 민가시오갈피 엽록체 유전자 지도

민가시오갈피와 두릅나무속 식물 4종의 오갈피, 섬오갈피, 흰털오갈피, 레퍼런스인 가시오갈피 (NC_016430) 5종의 엽록체 유전체 서열의 비교 분석 결과, 모두 5종의 cp genome 서열은 서열 유사도에서 0.991에서 1.000까지 확인되었다 (그림 1-41).

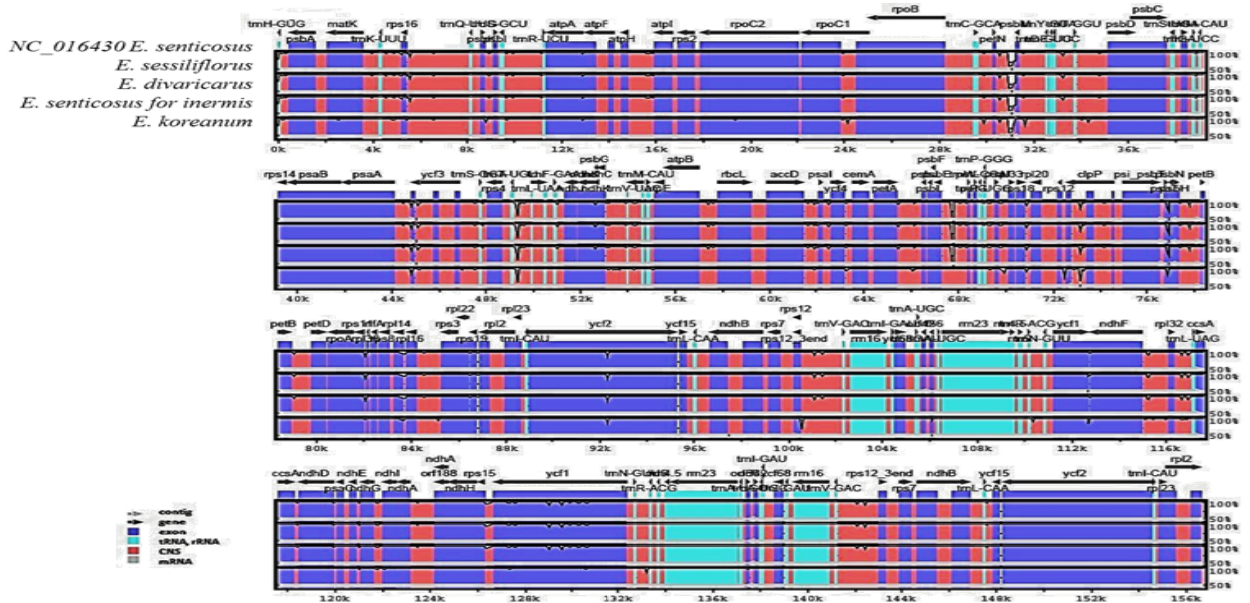


그림 1-41. 민가시오갈피 엽록체 유전체와 오갈피속 근연종 엽록체 유전체의 서열 비교 분석.

가시오갈피를 레퍼런스(NC_016430)로 오갈피, 흰털오갈피, 민가시오갈피, 섬오갈피를 비교.

블록 : 파랑 conserved gene, 밝은 파란색 trna, rna, 빨간색 intergenic region.

오갈피와 민가시오갈피는 cp genome 서열이 완벽히 일치하였고, 한국 자생종으로 알려진 섬오갈피는 레퍼런스인 가시오갈피와 0.994의 서열 유사도를 나타내며 다른 3종의 cp genome 과 차이를 보였다. 5종의 엽록체 gene products에서는, 민가시오갈피와 오갈피는 gene products가 동일하였으며, 섬오갈피와의 비교에서는 rpoC2, clpP gene를 비롯하여 54개의 유전자 영역에서 변이가 확인되었다. 이는 섬오갈피 특이적 종 간 변이로 판단된다. 오가과 및 산형과 주요 식물들의 NGS 염기서열 결과를 이용하여 엽록체 유전체 서열의 종 간 다양성을 확인하였으며, 이는 근연종 및 유사종의 약용 식물 간에 종의 taxon identification을 위한 고유종 특이적 분자마커로써 이용될 수 있을 것이다.

또한, 민가시오갈피 엽록체 유전체 서열 완성과 더불어 진행된 45s rDNA 서열 어셈블리를 수행하여 이들의 유전자부위를 결정하고, 위의 종 간 비교 분석을 완료하였다 (그림 1-42).

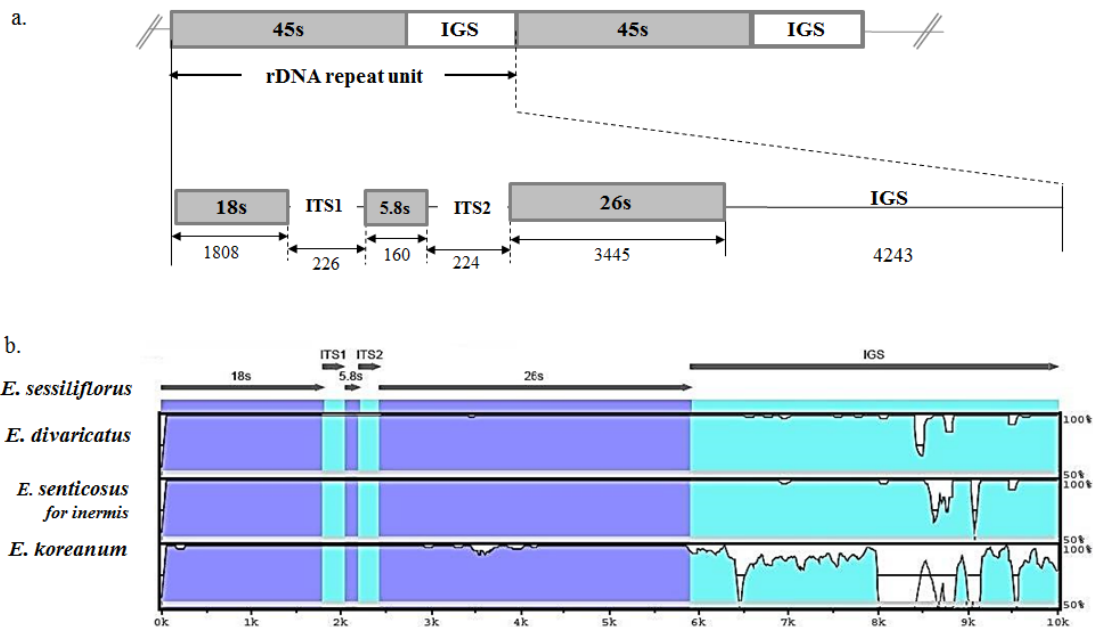


그림1-42. 민가시오갈피 45s nrDNA 서열의 유전자 부위 결정과 근연종간 변이 분석. a. 45s nrDNA 서열의 유전자 부위 결정 모식도 b. 근연종 4종(오갈피, 흰털오갈피, 민가시오갈피, 섬오갈피) 45s nrDNA 서열 비교 분석. 파란색 블록은 conserved gene, 밝은 파란색은 trna, rna, 빨간색 블록은 intergenic region을 나타내는 것임.

민가시오갈피의 45s rDNA 서열 어셈블리 결과, 18s-5.8s-26s 는 1808bp-160bp-3445bp, ITS1 and ITS2 는 각각 227bp, 224bp로 확인되었다. 그림은 오갈피 nrDNA 1 unit 의 어셈블리로 완성된 45s transcription 단위 사이에 존재하는 IGS length 를 확인한 것이다. 4종의 45s nrDNA 서열의 비교 분석 결과 오갈피와 흰털(개가시)오갈피는 45s nrDNA 영역이 완전히 일치하였고, 민가시오갈피는 ITS2 영역에서 하나의 SNP가 드러났다. 또한 섬오갈피에서 ITS1과 ITS2 에서 많은 변이가 나타났으며, 18s 및 26s에서도 각각 1개와 3개의 SNP 가 나타났다. 그

림은 오갈피 nrDNA unit 의 45s transcription 단위 사이에 존재하는 IGS length를 확인한 것으로 mVISTA를 이용하여 4종간의 rDNA unit의 서열 변이를 확인하였다.

2. 벼의 저장단백질 함량 조절 및 식미조절 마커 단백질 동정

본 연구는 다양한 벼 품종을 식미 (eating quality)에 따라서 품종을 감별하기 위한 마커 단백질을 동정하는 연구이다. 벼의 종자는 약 4.3 - 18.2%의 단백질을 함유하고 있으며 단백질 함량이 낮을수록 식미가 좋은 것으로 보고되었다. 그리고 기존의 연구 결과에 의하면 다양한 단백질의 disulfide bond (S-S bond)를 isomerization에 관여하여 단백질들의 기능과 안정성을 조절하는 Protein Disulfide Isomerase (PDI) 단백질, 다양한 단백질과 결합하여 대상 단백질들의 형태를 유지시켜서 안정성을 조절하는 Binding protein (BIP) 단백질, 그리고 벼 종자의 배유와 배아에서 다양한 저장 단백질의 발현을 조절하는 Rice Endosperm bZIP (REB) 단백질은 저장단백질의 안정성을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 다양한 저장 단백질의 안정성에 관여하는 PDI, BIP, REB 단백질들의 함량이 실질적으로 식미와 직접적인 상관관계가 있는지 조사하여 이들 단백질들이 식미를 판정하는데 중요한 마커 단백질로 사용 가능성을 조사하기 위한 연구를 수행하였다. 먼저 이들 단백질들의 함량을 조사하는데 가장 쉽게 접근할 수 있는 방법이 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)이기 때문에 PDI, BIP, REB 단백질들에 대한 항체를 생산하는 연구를 수행하였다. 항체를 제작하기 위해서 PDI, BIP, REB 단백질을 코딩하는 유전자를 대장균 발현벡터에 클로닝하고 이들 단백질을 대장균에 도입하여 과다 발현하였다. 과다발현된 대장균을 확보한 후 일반적인 affinity chromatography 방법을 이용하여 순수 분리하였다 (그림 2-1).

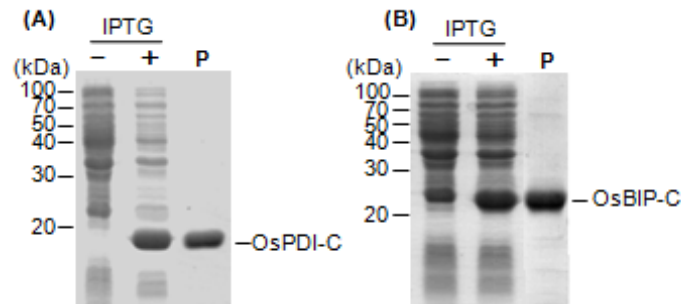


그림 2-1. Expression and purification of C-termini of OsPDI and OsBIP proteins. cDNA fragments encoding of OsPDI and OsBIP C-termini were amplified by PCR, digested with proper restriction enzymes, and then cloned into *E.coli* expression vector, pET28a. Recombinant plasmids were introduced into BL21 cells to over-express recombinant proteins. Transformed cells were cultured at 28°C until OD value at 260 nm is reached to 1.0 and then treated with 0.5M of IPTG for 5 hours. Cells were harvested and disrupted by ultrasonic tip. OsPDI-C and OsBIP-C were purified with nickel affinity column according to Manufacturer's instruction. To produce antibody, the purified recombinant protein was injected subcutaneously into one rabbit. Incomplete adjuvant was used in all subsequent injections.

순수 분리한 단백질들을 토끼에 주입하여 항체를 제작하여 식미가 서로 다른 9가지의 품종

즉 고품벼, 고시히까리, 삼광벼, 추청벼, 일품벼, 동진벼, 화청벼, 화성벼, 팔공벼의 종자에서 PDI, BIP, REB 단백질 함량을 조사하였다. 본 실험을 위해서 9가지 벼 품종을 동시에 파종하고 종자를 수확하였으며 수확한 종자를 액체 질소를 이용하여 분쇄하고 total protein을 추출하였다. 각 품종의 종자에서 추출된 단백질의 동일한 양을 SDS-PAGE를 통해서 전기영동하고 PDI, BIP, REB 단백질에 대한 항체를 이용하여 western blot을 실시하였다 (그림 2-2).

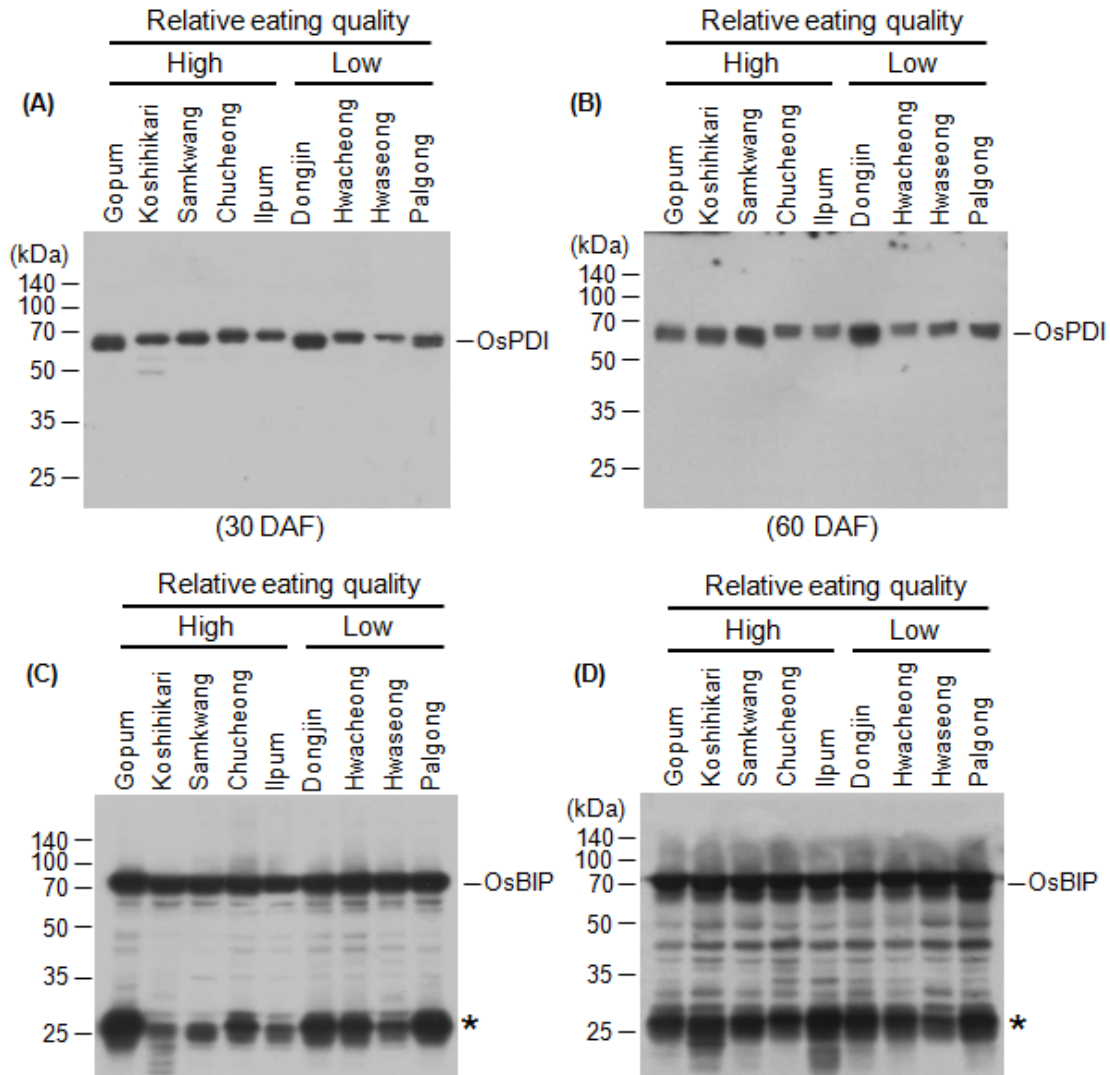


그림 2-2. Examination of OsPDI and OsBIP levels in the seeds of nine rice cultivars. Seeds of nine rice cultivars which have different eating quality were raised in the field. Seeds were collected 30 and 60 days after flowering and then ground with sea sand in liquid nitrogen. Protein amount was quantified by Bradford method. Equal amount of protein was loaded and separated by 10% PAGE containing SDS, and transferred onto PVDF membrane. Membranes were treated with anti-OsPDI or anti-OsBIP antibody and subsequently with secondary antibody. OsPDI and OsBIP protein bands were detected with ECL detection kit according to Manufacturer's instruction. DAF, day after flowering. Asterisks may indicate non-specific bands.

그 결과 PDI 단백질과 BIP 단백질의 함량이 고식미 또는 저식미 특이적으로 함량이 다르게 나타나는 양상은 없었다. 현재의 연구 접근 방법과 연구 결과에서는 PDI 단백질과 BIP 단백질의 함량이 식미와는 직접적인 관계가 없는 것처럼 나타났다. 그러나 이결과로서 PDI와 BIP 단

백질의 함량이 식미와는 전혀 연관이 없다고 단정 지을 수 없다. PDI 단백질과 BIP 단백질의 함량이 식미와의 연관성을 보다 상세하게 조사하기 위해서 종자 발아 단계에서 이들 단백질의 함량을 검사하였으나 각각 12시간과 24시간 동안 수분을 흡수하여 발아를 유도한 후의 조건에서도 PDI 단백질과 BIP 단백질의 함량이 식미와 상호 연관성이 없는 것처럼 나타났다.

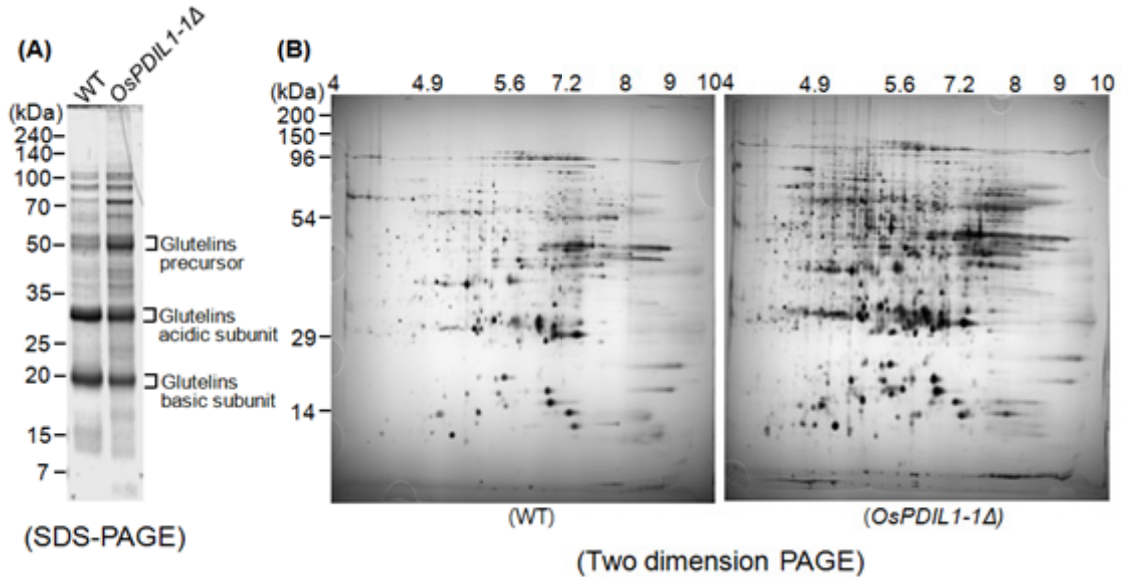


그림 2-3. Analysis of storage proteins in the seeds of *OsPDIL1-1Δ* mutant. Seeds of *OsPDIL1-1Δ* mutants were grown in the field. Seeds at 50 days after flowering were harvested and ground with sea sand in liquid nitrogen. Protein amount was quantified using the Bradford method. Equal amounts of protein were loaded and separated by SDS-PAGE (A) or two-dimensional PAGE (B).

그러나 이결과로서 PDI와 BIP 단백질의 함량이 식미와는 전혀 연관이 없다고 단정 지을 수 없기 때문에 현재는 벼의 종자가 발아 후 종실을 맺을 때까지 발달 단계별로 시료를 확보하여 western blot을 통해서 PDI와 BIP 단백질의 함량과 식미와의 상관 관계를 조사 중이며 PDI 돌연변이체 종자를 2-D PAGE (그림 2-3)로 분석하였으며 그 결과 34개 단백질들의 함량이 돌연변이체에서 증가하였음을 알 수 있었다 (표 2-1).

표 2-1. List of the proteins showed difference of intensities more than two-folds between WT and *OsPDIL1-1Δ*

Spot No.	Homologous protein	PI	MR	1st		2nd	
				동진벼	<i>OsPDIL 1-1Δ</i>	동진벼	<i>OsPDIL 1-1Δ</i>
3107R	hypothetical protein (bacterial/archaeal PhosphatidylEthanolamine-Binding Protein)	5.15	19.61	1	2270.88	1	1709.72
8003R	hypothetical protein (Nucleoside diphosphate kinase III)	7.56	13.94	1	1312.84	1	1405.59
4520R	hypothetical protein (Phosphoglycerate kinase, cytosolic)	5.23	47.39	1	866.06	1	1311.58
1003R	hypothetical protein (Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase domain)	4.61	11.51	1	2105.78	74.28	1374.67

Spot No.	Homologous protein	PI	MR	1st		2nd	
				동진번호	<i>OsPDIL 1-1Δ</i>	동진번호	<i>OsPDIL 1-1Δ</i>
4203R	containing protein) unknown protein	5.20	36.74	1	588.13	1	915.52
8313R	hypothetical protein (Annexin)	7.99	37.82	1	1493	842.07	1799.13
5204R	hypothetical protein	5.46	33.24	1	780.41	1	577.29
4402R	hypothetical protein (Phosphoglycerate kinase, cytosolic)	5.23	46.15	1	485.15	1	817.02
0004R	hypothetical protein (Thioredoxin H-type (TRX-H))	4.30	10.62	1	954.26	77.06	483.89
7207R	hypothetical protein (Ricin B-related lectin domain containing protein)	7.02	36.04	1	380.32	1	564.36
3005R	peroxiredoxin 5 cell rescue, defense and virulence	5.06	14.89	1	674.08	1	245.58
5409R	hypothetical protein (Phosphoglycerate kinase, cytosolic)	5.54	47.58	35.76	555.44	1	885.41
0006R	hypothetical protein (Jacalin-like lectin domain)	4.42	11.15	1	363	1	337.09
4202R	unknown protein	5.20	35.83	1	187.67	1	449.94
6511R	hypothetical protein (Tryptophan synthase beta chain 1)	6.07	49.30	54.16	302.28	1	276.32
8009R	hypothetical protein (Nucleoside diphosphate kinase III)	7.74	13.89	1	259.79	144.29	821.77
6808R	hypothetical protein (Ethylene-responsive methionine synthase)	6.06	88.82	432.64	1108.8	29.53	1859.3
5103R	hypothetical protein (Pathogen-related protein (JIOsPR10))	5.47	15.53	228.26	5425.54	251.21	3393.08
1002R	hypothetical protein	4.58	13.47	39.1	1353.84	317.26	756.18
7101R	hypothetical protein (P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases)	6.30	22.84	184.51	379.05	72.05	1067.83
8201R	hypothetical protein (Annexin)	7.23	35.93	136.65	1111.2	170.08	1099.36
4102R	hypothetical protein (Iron/manganese superoxide dismutases)	5.20	25.43	260.01	2331.78	734.61	2578.43
0007R	hypothetical protein (Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase domain containing protein)	4.52	11.45	123.87	407.61	55.9	510.18
1307R	hypothetical protein (Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase domain containing protein)	4.73	39.38	37.66	383.22	183.53	367.42
4406R	hypothetical protein (Phosphoglycerate kinase, cytosolic)	5.26	46.18	291.09	1420.95	185.22	1231.2
5111R	hypothetical protein (Peroxiredoxin 6)	5.52	27.51	237.63	1537.77	891.33	2733.12
1705R	endosperm luminal binding protein	4.65	81.98	658.21	3642.48	746.09	2416.03
6502R	hypothetical protein (Cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase)	5.60	52.79	627.47	1791.62	152.43	841.81
5105R	hypothetical protein	5.48	16.88	274.48	1365.86	546.76	1762.57
6604R	hypothetical protein (Mercuric reductase family protein)	5.78	55.36	148.11	490.95	88.09	394.51

Spot No.	Homologous protein	PI	MR	1st		2nd	
				동진벼	<i>OsPDIL 1-1Δ</i>	동진벼	<i>OsPDIL 1-1Δ</i>
3203R	hypothetical protein (Glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase domain containing protein)	5.09	32.06	717.21	1891.84	427.35	1575.02
4413R	hypothetical protein (Phosphoglycerate kinase, cytosolic)	5.36	46.16	448.33	1351.23	495.86	1586.28
7501R	Putative alanine aminotransferase	6.27	53.95	372.62	773.71	151.1	457.03
5502R	hypothetical protein (Transferase family protein)	5.40	49.83	805.1	1710.69	587.18	1344.15
7807R	GT1_Sucrose_synthase	6.99	94.91	970.01	89.88	540.53	1

한편 현재까지 동정된 종자 저장 단백질외에 식미와 관련된 다른 단백질을 동정하기 위해서 식미가 서로 다른 9개의 벼 품종인 고품벼, 고시히카리, 삼광벼, 추청벼, 일품벼, 삼남, 신금오, 도봉, 팔공벼의 종자를 이용하여 2-D PAGE를 실시하였다. 동일한 조건에서 발아하고 성숙된 종자를 이용하는 것이 가장 중요한 점이기 때문에 2010년도에 동시에 파종하고 동일한 논에서 성숙된 종자를 확보하여 실험을 수행하였다. (그림 2-4).

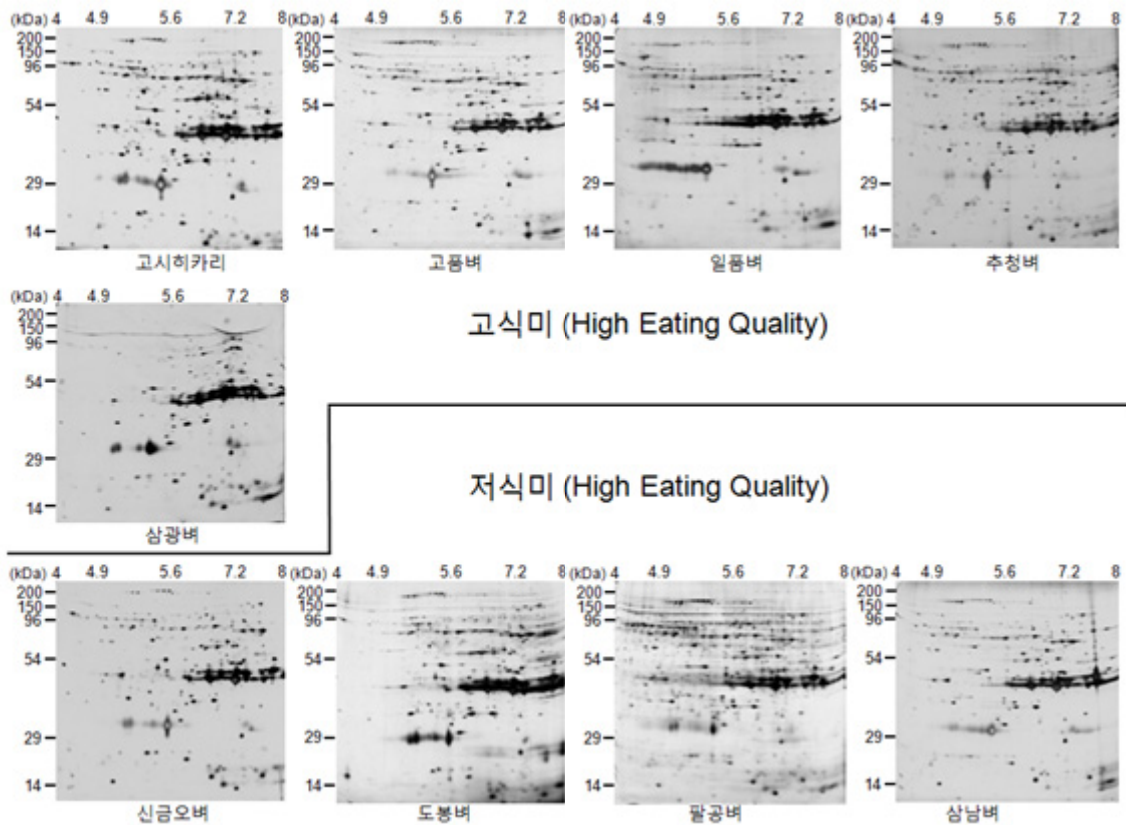


그림 2-4. Analysis of storage proteins in the seeds of nine rice cultivars. Seeds of nine cultivars which have different eating qualities were grown in the field. Seeds at 50 days after flowering were ground with sea sand in liquid nitrogen. Protein amount was quantified using the Bradford method. Equal amounts of protein were loaded and separated by 2-D gel electrophoresis. Red circles indicate the protein spots which are highly accumulated in cultivars with high eating quality.

벼에서 PDI 단백질은 다양한 조직과 기관에서 발현이 되며 특히 종자의 경우 개화 후 많은 양이 생성되어 종자 발달에 관여하는 것으로 예상되었다. 따라서 고식미와 저식미를 이용하고 단백질체학 방법을 사용하여 고식미와 저식미 종자에서 PDI 단백질 함량을 조사한 결과 고식미에서 상대적으로 함량이 높고 다양하게 변화된 형태로 존재함을 알 수 있었다.

그 후 OsPDI 단백질을 코딩하는 유전자가 파괴된 돌연변이 벼 *OsPDIL1-1Δ*를 분리 동정하는 연구를 수행하였다. OsPDI 단백질을 대장균에서 발현하고 분리한 후 항체를 생산하여 면역반응 (immunoblot) 방법을 통해서 OsPDI 단백질 합성이 파괴된 *OsPDIL1-1Δ* 벼를 분리하였으며 분리한 *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이 벼의 종자를 표현형 측면과 탄수화물과 단백질 차원에서 동정하였다. 그 결과 *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이 종자의 경우 비정형을 나타내었으며 (그림 2-5) 또한 종자내부의 경우 백악질 (chalky) 형태로 존재함을 알 수 있었는데 (그림 2-5) 이는 최소한 탄수화물의 조성이나 구조가 변화되었음을 암시하였다.

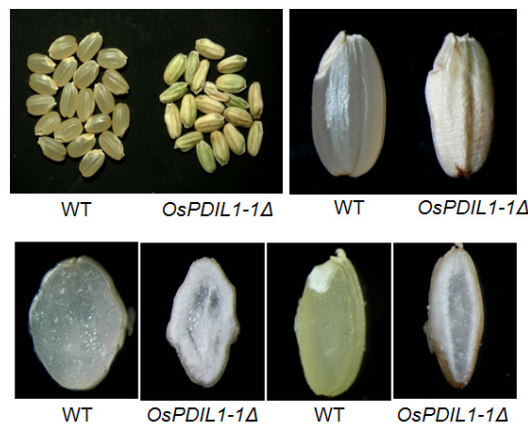


그림 2-5. *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이의 종자 표현형. *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이의 종자가 부정형과 탄수화물 조성변화를 의미하는 chalky 표현형을 보임

따라서 먼저 종자내에서 탄수화물 함량과 조성 및 free sugar의 함량을 조사한 결과 작지만 돌연변이에서 탄수화물 함량이 감소하였으며 아밀로스 함량 역시 감소하였음을 알 수 있었다 (표 2-2).

표 2-2. Dongjin and *OsPDIL1-1Δ* 종자에서 starch와 amylose 함량 비교

Cultivar	Starch content		Amylose content (%)	
	Dongjin	<i>OsPDIL1-1Δ</i>	Dongjin	<i>OsPDIL1-1Δ</i>
% milled rice weight	90%	88%	18.9%	18.3%

한편 free sugar인 sucrose, glucose, maltose 함량을 조사한 결과 sucrose 함량이 돌연변이의 종자에서 크게 감소하였으며, 반대로 glucose와 maltose 함량은 오히려 증가하였음을 알 수 있었다 (표 2-3).

표 2-3. Dongjin and *OsPDIL1-1Δ* 종자에서 free sugar 함량 비교

	Dongjin (mg/ml)	<i>OsPDIL1-1Δ</i> (mg/ml)
Sucrose	10.00	8.620
Glucose	8.992	14.42
Maltose	9.058	12.80
Total free sugar	27.96	35.84

이 결과는 PDI 단백질 함량이 변화될 경우 종자내에 sucrose 함량 변화를 유도하게 됨을 의미한다. 한편 *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이 벼의 종자내에 sucrose 함량이 감소한 것은 돌연변이 종자가 식미 감소하였을 가능성을 의미하며 이는 돌연변이 종자의 식미가 변화(떨어짐)를 유도할 것으로 생각된다. 결과적으로 PDI 단백질 함량이 식미를 조절하는 중요한 요소로 작용할 수 있음을 의미한다. 또한 *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이 벼의 종자내에서 단백질 함량을 분석하였는데 돌연변이의 종자에서 단백질 함량이 감소함을 알 수 있었는데 (그림 2-6) 이는 PDI 단백질이 저장 단백질 합성 또는 안정성 조절에 중요한 역할을 담당함을 의미한다.

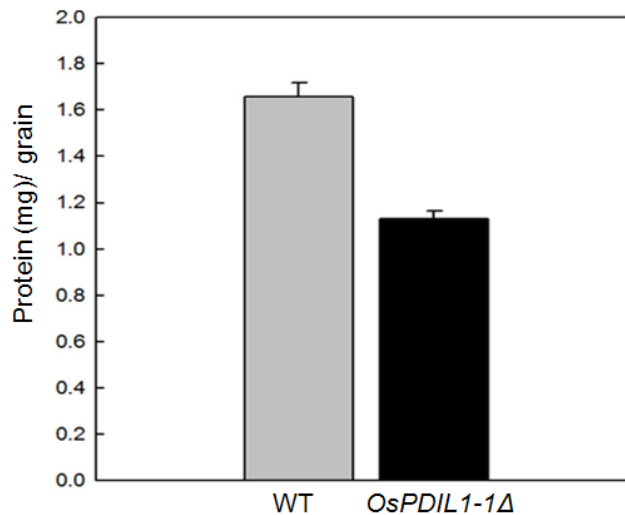


그림 2-6. *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이의 종자의 단백질 함량조사. *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이의 종자에서 저장 단백질 함량이 감소함.

한편 일반적으로 단백질 함량이 낮을수록 식미가 좋아지는 것으로 알려져 있기 때문에 돌연변이 벼의 경우 저장단백질 함량이 낮기 때문에 식미가 더 좋을 것으로 예상할 수 있다. 이들 결과는 PDI 단백질이 종자발달 동안 발현되어 기능을 발휘하는 것을 의미하므로 개화 후 종자 발달 동안 PDI 함량을 조사하였다. 그 결과 PDI 단백질은 개화 후부터 종자가 성숙할 때 까지 다량으로 발현 축적됨을 알 수 있었다 (그림 2-7).

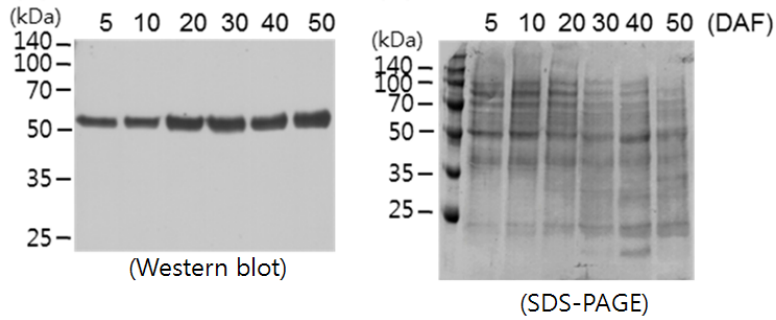


그림 2-7. OsPDI 단백질 발현양상 조사. 개화 후 5일부터 50일까지 종자발달 동안에 OsPDI 단백질 함량을 OsPDI에 대한 항체를 이용하여 면역반응 (immunoblot) 방법으로 조사. DAF, day after flowering.

종자 발달 기작을 밝히고 또한 식미를 조절하고자하는 많은 연구가 수행되어서 현재 PDI 단백질 외에 저장 단백질 합성과 안정성에 관여하는 또 다른 단백질인 샤페론 BiP (binding protein)와 전사인자 REB (rice endosperm binding)가 동정되었다. 따라서 이들 단백질이 OsPDI 합성이 파괴되었을 경우 함량 변화가 있는지의 여부를 면역 반응을 통해서 조사하였다. OsBiP 단백질과 OsREB 단백질을 대장균에서 발현하고 순수 분리하여 OsBiP 단백질과 OsREB 단백질에 대한 항체를 생산하여 *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이 벼의 종자에서 단백질을 추출하여 이들의 함량을 조사하였다. 그 결과 샤페론으로서 저장단백질 안정성을 조절하여 종자내의 저장단백질 함량을 조절하는 것으로 알려진 OsBiP 함량을 돌연변이의 종자에서 증가하였는데 저장단백질의 발현에 관여하여 저장단백질 함량 조절에 관여하는 OsREB이 함량은 오히려 감소하였음을 알 수 있었다. 이는 OsPDI 단백질이 이들 OsBiP 단백질과 OsREB 단백질의 함량을 조절하여 저장단백질의 함량을 조절함을 의미한다.

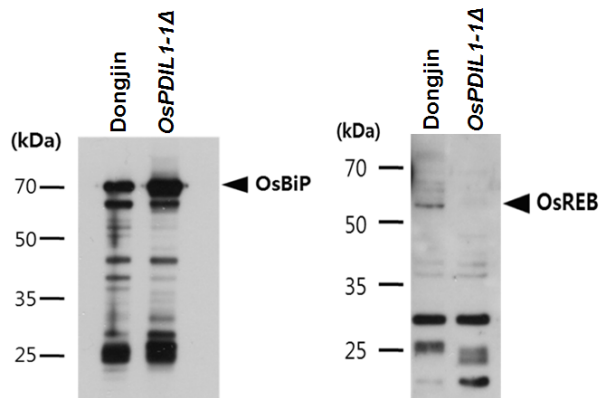


그림 2-8. *OsPDIL1-1Δ* 돌연변이의 종자에서 OsBiP와 OsREB 함량조사. 저장단백질 안정성에 관여하는 OsBiP와 저장단백질 발현을 조절하는 OsREB 함량을 각각 OsBiP와 OsREB에 대한 항체를 이용하여 면역반응 (immunoblot) 방법으로 조사한 결과 OsBiP의 함량은 증가하는 반면에 OsREB의 함량은 감소함.

결론적으로 OsPDI 단백질은 저장단백질의 안정성에 관여하는 OsBiP와 OsREB의 함량을 조절하여 벼의 종자내에서 저장단백질 함량 변화를 유도하여 식미를 조절할 수 있음을 알 수 있

있으며 또한 OsPDI 단백질이 sucrose 함량 조절을 통해서 벼의 식미 조절 가능성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 PDI 단백질이 식미를 조절하는 중요한 단백질로서 PDI 단백질 함량이 식미를 판정하는 마커 단백질로서의 이용 가능성이 있음을 알 수 있었다.

3. 배추의 고탍량 베타카로틴 생합성 관련 분자마커 개발

가. 고탍량 vitamin, carotenoids 결정 형질 유전자지도 작성용 집단육성

F2 3집단 BN 6004(S510-G6 x NS-G6), 6005(325-G7 x S955-G8), 6006(325-G7 x NS-G6)을 각각 300립씩 128구 연결포트에 1립씩 파종하여 발아 시킨 후 15일후에 5℃를 유지하는 냉장실에서 20시간 일장처리를 하여 40일간 저온처리 하였다. 이들을 10 cm 비닐포트에 정식후 백열등으로 일장이 18시간이 되도록 보광을 하고 최저온도 18℃를 유지하면서 재배하였다. 이후, DNA 분석을 위해 F2 개체의 잎을 채취하였다. 또한 오렌지 내엽색은 화색(pale-yellow)과 co-segregation하므로, F2 집단의 화색 표현형 역시 조사하였다. F2 집단의 화색 표현형 조사 결과(표 3-1, 3-2, 3-3), 오렌지색을 발현하게 하는 유전인자가 단일자 열성으로 작용하고, 따라서 F2 집단에서 노랑색 내엽과 오렌지색 내엽이 3:1로 분리되는 것을 확인할 수 있었다(표 3-4).

표 3-1. F2 집단들의 양친 특성 및 화색 검정 결과 및 분석

<BN 6004>

- . 모계: 계통명: S510-G6 계통 특성: 내엽 오렌지색, 뿌리혹병 강함
- . 부계: 계통명: NS-G6 계통 특성: 내엽 노랑색, 뿌리혹병 약함

교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색
6004-1	O	6004-43	Y	6004-85	O	6004-127	Y	6004-169	Y	6004-211	O
6004-2	Y	6004-44	O	6004-86	Y	6004-128	Y	6004-170	Y	6004-212	O
6004-3	Y	6004-45	Y	6004-87	Y	6004-129	Y	6004-171	Y	6004-213	Y
6004-4	O	6004-46	Y	6004-88	O	6004-130	O	6004-172	O	6004-214	Y
6004-5	Y	6004-47	Y	6004-89	Y	6004-131	Y	6004-173	Y	6004-215	Y
6004-6	Y	6004-48	Y	6004-90	Y	6004-132	Y	6004-174	Y	6004-216	O
6004-7	Y	6004-49	Y	6004-91	Y	6004-133	Y	6004-175	Y	6004-217	O
6004-8	Y	6004-50	O	6004-92	O	6004-134	O	6004-176	Y	6004-218	Y
6004-9	O	6004-51	Y	6004-93	O	6004-135	Y	6004-177	O	6004-219	Y
6004-10	Y	6004-52	Y	6004-94	O	6004-136	Y	6004-178	O	6004-220	Y
6004-11	Y	6004-53	Y	6004-95	O	6004-137	Y	6004-179	O	6004-221	Y
6004-12	O	6004-54	Y	6004-96	Y	6004-138	Y	6004-180	Y	6004-222	Y
6004-13	Y	6004-55	O	6004-97	Y	6004-139	XXX	6004-181	O	6004-223	Y
6004-14	Y	6004-56	Y	6004-98	Y	6004-140	O	6004-182	Y	6004-224	O
6004-15	Y	6004-57	Y	6004-99	Y	6004-141	Y	6004-183	O	6004-225	O
6004-16	Y	6004-58	Y	6004-100	O	6004-142	Y	6004-184	Y	6004-226	Y
6004-17	Y	6004-59	Y	6004-101	O	6004-143	Y	6004-185	Y	6004-227	O
6004-18	Y	6004-60	Y	6004-102	O	6004-144	Y	6004-186	Y	6004-228	Y
6004-19	O	6004-61	O	6004-103	Y	6004-145	Y	6004-187	Y	6004-229	Y
6004-20	Y	6004-62	Y	6004-104	O	6004-146	Y	6004-188	Y	6004-230	Y
6004-21	Y	6004-63	O	6004-105	Y	6004-147	Y	6004-189	Y	6004-231	Y
6004-22	Y	6004-64	O	6004-106	Y	6004-148	XXX	6004-190	O	6004-232	Y
6004-23	Y	6004-65	xxx	6004-107	Y	6004-149	Y	6004-191	Y	6004-233	Y
6004-24	Y	6004-66	O	6004-108	Y	6004-150	Y	6004-192	O	6004-234	Y
6004-25	Y	6004-67	Y	6004-109	Y	6004-151	Y	6004-193	Y	6004-235	Y
6004-26	Y	6004-68	Y	6004-110	Y	6004-152	O	6004-194	O	6004-236	Y
6004-27	Y	6004-69	Y	6004-111	Y	6004-153	Y	6004-195	Y	6004-237	O
6004-28	Y	6004-70	Y	6004-112	Y	6004-154	O	6004-196	Y	6004-238	Y
6004-29	O	6004-71	Y	6004-113	Y	6004-155	Y	6004-197	Y	6004-239	Y

6004-30	Y	6004-72	Y	6004-114	Y	6004-156	Y	6004-198	Y	6004-240	Y
6004-31	Y	6004-73	Y	6004-115	Y	6004-157	Y	6004-199	Y	6004-241	O
6004-32	Y	6004-74	Y	6004-116	Y	6004-158	Y	6004-200	Y	6004-242	Y
6004-33	Y	6004-75	Y	6004-117	Y	6004-159	Y	6004-201	Y	6004-243	Y
6004-34	O	6004-76	O	6004-118	Y	6004-160	O	6004-202	Y	6004-244	Y
6004-35	Y	6004-77	O	6004-119	O	6004-161	Y	6004-203	Y	6004-245	O
6004-36	Y	6004-78	Y	6004-120	O	6004-162	Y	6004-204	Y	6004-246	Y
6004-37	Y	6004-79	Y	6004-121	Y	6004-163	O	6004-205	Y	6004-247	Y
6004-38	O	6004-80	Y	6004-122	Y	6004-164	Y	6004-206	O	6004-248	Y
6004-39	Y	6004-81	Y	6004-123	Y	6004-165	Y	6004-207	Y	6004-249	XXX
6004-40	Y	6004-82	O	6004-124	Y	6004-166	Y	6004-208	Y	6004-250	Y
6004-41	Y	6004-83	Y	6004-125	Y	6004-167	Y	6004-209	O		
6004-42	Y	6004-84	Y	6004-126	O	6004-168	O	6004-210	O		

O: Orang color

Y: Yellow color

XXX: 결주

Orange color: 61개체

Yellow color: 185개체

표 3-2. F2 집단들의 양친 특성 및 화색 검정 결과 및 분석

<BN 6005>

. 모계: 계통명: 325-G7 계통 특성: 내엽 오렌지색, 모용 없음, 뿌리혹병 약함

. 부계: 계통명: S955-G8 계통 특성: 내엽 노랑색, 모용 있음, 뿌리혹병 강함

교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색
6005-1	Y	6005-44	Y	6005-87	Y	6005-130	O	6005-173	Y	6005-216	O
6005-2	Y	6005-45	Y	6005-88	Y	6005-131	Y	6005-174	Y	6005-217	Y
6005-3	Y	6005-46	O	6005-89	Y	6005-132	Y	6005-175	XXX	6005-218	Y
6005-4	Y	6005-47	Y	6005-90	Y	6005-133	Y	6005-176	O	6005-219	Y
6005-5	Y	6005-48	Y	6005-91	O	6005-134	Y	6005-177	Y	6005-220	Y
6005-6	Y	6005-49	O	6005-92	Y	6005-135	O	6005-178	Y	6005-221	Y
6005-7	O	6005-50	Y	6005-93	Y	6005-136	Y	6005-179	Y	6005-222	Y
6005-8	O	6005-51	O	6005-94	Y	6005-137	O	6005-180	O	6005-223	Y
6005-9	Y	6005-52	Y	6005-95	O	6005-138	Y	6005-181	Y	6005-224	O
6005-10	Y	6005-53	Y	6005-96	Y	6005-139	Y	6005-182	Y	6005-225	Y
6005-11	O	6005-54	Y	6005-97	Y	6005-140	Y	6005-183	Y	6005-226	Y
6005-12	Y	6005-55	Y	6005-98	Y	6005-141	Y	6005-184	Y	6005-227	O
6005-13	Y	6005-56	O	6005-99	O	6005-142	O	6005-185	Y	6005-228	Y
6005-14	Y	6005-57	Y	6005-100	O	6005-143	XXX	6005-186	Y	6005-229	Y
6005-15	Y	6005-58	Y	6005-101	Y	6005-144	Y	6005-187	Y	6005-230	Y
6005-16	Y	6005-59	Y	6005-102	Y	6005-145	Y	6005-188	Y	6005-231	O
6005-17	Y	6005-60	O	6005-103	Y	6005-146	Y	6005-189	Y	6005-232	Y
6005-18	Y	6005-61	Y	6005-104	Y	6005-147	Y	6005-190	Y	6005-233	O
6005-19	Y	6005-62	Y	6005-105	Y	6005-148	Y	6005-191	Y	6005-234	Y
6005-20	Y	6005-63	Y	6005-106	Y	6005-149	O	6005-192	Y	6005-235	Y
6005-21	Y	6005-64	O	6005-107	Y	6005-150	Y	6005-193	Y	6005-236	XXX
6005-22	Y	6005-65	Y	6005-108	Y	6005-151	O	6005-194	Y	6005-237	O
6005-23	Y	6005-66	Y	6005-109	Y	6005-152	O	6005-195	Y	6005-238	Y
6005-24	O	6005-67	Y	6005-110	Y	6005-153	Y	6005-196	Y	6005-239	Y
6005-25	O	6005-68	O	6005-111	Y	6005-154	O	6005-197	Y	6005-240	Y
6005-26	Y	6005-69	Y	6005-112	O	6005-155	Y	6005-198	O	6005-241	O
6005-27	O	6005-70	O	6005-113	Y	6005-156	O	6005-199	Y	6005-242	Y
6005-28	Y	6005-71	Y	6005-114	O	6005-157	Y	6005-200	Y	6005-243	Y
6005-29	Y	6005-72	O	6005-115	O	6005-158	Y	6005-201	Y	6005-244	Y
6005-30	Y	6005-73	O	6005-116	Y	6005-159	Y	6005-202	Y	6005-245	Y
6005-31	Y	6005-74	Y	6005-117	Y	6005-160	Y	6005-203	Y	6005-246	Y
6005-32	Y	6005-75	Y	6005-118	Y	6005-161	Y	6005-204	O	6005-247	O
6005-33	Y	6005-76	Y	6005-119	O	6005-162	Y	6005-205	O	6005-248	Y
6005-34	Y	6005-77	Y	6005-120	Y	6005-163	Y	6005-206	XXX	6005-249	Y
6005-35	Y	6005-78	Y	6005-121	O	6005-164	O	6005-207	Y	6005-250	O
6005-36	Y	6005-79	O	6005-122	O	6005-165	O	6005-208	Y	6005-251	O
6005-37	O	6005-80	Y	6005-123	Y	6005-166	Y	6005-209	Y	6005-252	O
6005-38	Y	6005-81	Y	6005-124	O	6005-167	Y	6005-210	O	6005-253	Y
6005-39	Y	6005-82	Y	6005-125	O	6005-168	Y	6005-211	Y	6005-254	Y
6005-40	Y	6005-83	Y	6005-126	Y	6005-169	Y	6005-212	Y	6005-255	Y
6005-41	Y	6005-84	Y	6005-127	XXX	6005-170	Y	6005-213	O		
6005-42	O	6005-85	O	6005-128	Y	6005-171	O	6005-214	Y		
6005-43	Y	6005-86	O	6005-129	Y	6005-172	Y	6005-215	Y		

Orange color: 62개체 Yellow color: 188개체

표 3-3. F2 집단들의 양친 특성 및 화색 검정 결과 및 분석

<BN 6006>

. 모계: 계통명: 325-G7 계통 특성: 내엽 오렌지색, 모용 없음, 뿌리혹병 약함

. 부계: 계통명: NS-G6 계통 특성: 내엽 노랑색, 모용 있음, 뿌리혹병 약함

교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색	교배번호	화색
6006-1	Y	6006-44	Y	6006-87	Y	6006-130	Y	6006-173	Y	6006-216	Y
6006-2	Y	6006-45	Y	6006-88	O	6006-131	Y	6006-174	Y	6006-217	O
6006-3	Y	6006-46	O	6006-89	O	6006-132	O	6006-175	O	6006-218	Y
6006-4	Y	6006-47	O	6006-90	Y	6006-133	Y	6006-176	O	6006-219	Y
6006-5	Y	6006-48	Y	6006-91	Y	6006-134	Y	6006-177	O	6006-220	O
6006-6	O	6006-49	Y	6006-92	Y	6006-135	O	6006-178	Y	6006-221	Y
6006-7	O	6006-50	Y	6006-93	Y	6006-136	Y	6006-179	O	6006-222	Y
6006-8	Y	6006-51	O	6006-94	O	6006-137	Y	6006-180	Y	6006-223	Y
6006-9	Y	6006-52	Y	6006-95	O	6006-138	Y	6006-181	Y	6006-224	Y
6006-10	Y	6006-53	Y	6006-96	Y	6006-139	Y	6006-182	Y	6006-225	Y
6006-11	Y	6006-54	Y	6006-97	Y	6006-140	O	6006-183	Y	6006-226	O
6006-12	O	6006-55	Y	6006-98	Y	6006-141	Y	6006-184	Y	6006-227	Y
6006-13	O	6006-56	Y	6006-99	Y	6006-142	Y	6006-185	Y	6006-228	Y
6006-14	Y	6006-57	Y	6006-100	Y	6006-143	Y	6006-186	Y	6006-229	O
6006-15	Y	6006-58	Y	6006-101	Y	6006-144	O	6006-187	Y	6006-230	O
6006-16	Y	6006-59	Y	6006-102	Y	6006-145	Y	6006-188	Y	6006-231	O
6006-17	O	6006-60	Y	6006-103	Y	6006-146	Y	6006-189	Y	6006-232	Y
6006-18	O	6006-61	Y	6006-104	Y	6006-147	O	6006-190	Y	6006-233	Y
6006-19	O	6006-62	Y	6006-105	O	6006-148	Y	6006-191	Y	6006-234	Y
6006-20	Y	6006-63	Y	6006-106	Y	6006-149	O	6006-192	Y	6006-235	Y
6006-21	O	6006-64	O	6006-107	Y	6006-150	Y	6006-193	Y	6006-236	Y
6006-22	Y	6006-65	Y	6006-108	Y	6006-151	Y	6006-194	Y	6006-237	Y
6006-23	O	6006-66	Y	6006-109	Y	6006-152	Y	6006-195	Y	6006-238	Y
6006-24	Y	6006-67	O	6006-110	Y	6006-153	Y	6006-196	Y	6006-239	O
6006-25	Y	6006-68	Y	6006-111	Y	6006-154	O	6006-197	Y	6006-240	Y
6006-26	Y	6006-69	O	6006-112	Y	6006-155	Y	6006-198	Y		
6006-27	Y	6006-70	Y	6006-113	Y	6006-156	Y	6006-199	O		
6006-28	Y	6006-71	Y	6006-114	O	6006-157	Y	6006-200	Y		
6006-29	Y	6006-72	Y	6006-115	Y	6006-158	Y	6006-201	Y		
6006-30	Y	6006-73	O	6006-116	Y	6006-159	Y	6006-202	Y		
6006-31	Y	6006-74	Y	6006-117	Y	6006-160	Y	6006-203	Y		
6006-32	Y	6006-75	Y	6006-118	Y	6006-161	O	6006-204	Y		
6006-33	Y	6006-76	O	6006-119	O	6006-162	Y	6006-205	Y		
6006-34	Y	6006-77	Y	6006-120	Y	6006-163	Y	6006-206	Y		
6006-35	Y	6006-78	O	6006-121	Y	6006-164	Y	6006-207	Y		
6006-36	Y	6006-79	Y	6006-122	Y	6006-165	Y	6006-208	Y		
6006-37	O	6006-80	Y	6006-123	Y	6006-166	Y	6006-209	O		
6006-38	O	6006-81	Y	6006-124	O	6006-167	Y	6006-210	O		
6006-39	Y	6006-82	O	6006-125	Y	6006-168	Y	6006-211	O		
6006-40	Y	6006-83	O	6006-126	Y	6006-169	Y	6006-212	Y		
6006-41	Y	6006-84	Y	6006-127	Y	6006-170	Y	6006-213	Y		
6006-42	Y	6006-85	Y	6006-128	Y	6006-171	Y	6006-214	Y		
6006-43	Y	6006-86	Y	6006-129	Y	6006-172	Y	6006-215	Y		

Orange Yellow color: 53개 체

or: 187개 체

표 3-4. 3개의 F2집단 표현형 chi-square test 결과

F2 population <BN6004> S510-G6(P1) X NS-G6(P2)

	총 개체수	Yellow inner leaves	Orange inner leaves	결주	chi-square value	p value
P1(S510-G6)	20	0	20			
P2(NS-G6)	20	20	0			
F2	250	185	61	4	0.00542	0.9413

F2 population <BN6005> 325-G7(P1) X S955-G8(P2)

	총 개체수	Yellow inner leaves	Orange inner leaves	결주	chi-square value	p value
P1(S510-G6)	20	0	20			
P2(NS-G6)	20	20	0			
F2	255	188	62	5	0.00533	0.9418

F2 population <BN6006> 325-G7(P1) X NS-G6(P2)

	총 개체수	Yellow inner leaves	Orange inner leaves	결주	chi-square value	p value
P1(325-G7)	20	0	20			
P2(NS-G6)	20	20	0			
F2	240	187	53	0	1.08889	0.2967

나. 다양한 농업특성의 배추 계통유지 및 생육 특성조사

농업특성이 다양한 21 계통들을 128구 연결포트에 파종하여 18일 재배한 후 포장에 정식하였다. 이후 이들의 원예적 특징들을 조사하였다(그림 3-1, 표 3-5). 22 계통 간에 다양한 표현형 차이를 확인할 수 있었다.



그림 3-1. 대표적 특성 조사 사진

표 3-5. 특성 조사표

No.	결구형 1:열립 5:단립	외엽색 1:연록 5:농록	내엽색 W:흰색 Y:노란색 O:오렌지색	엽장 cm	엽폭 cm	구고 cm	구폭 cm	숙기 1:조 5:만	모용 0:없음 5:많음	근류병 0:약 5:강
1	2	4	Y	37	26	20	10	3	5	0
2	4	5	Y	37	28	24	13	3	5	5
3	5	5	Y	40	32	24	17	3	5	5
4	2	2	W	31	27	27	9	2	0	0
5	3	2	O	30	24	20	14	3	0	0
6	3	2	O	30	24	20	13	2	0	5
7	3	2	O	30	27	19	13	3	5	0
8	3	3	O	37	30	32	11	3	0	0
9	4	2	O	40	25	21	13	3	5	0
10	5	4	Y	35	23	22	12	3	5	0
11	5	4	Y	37	24	34	19	4	5	0
12	3	2	Y	45	30	23	20	5	5	5
13	4	3	Y	42	28	23	13	2	5	5
14	3	2	Y	32	25	20	12	3	5	0
15	5	4	Y	40	30	26	16	4	5	0
16	4	2	Y	39	30	28	16	3	5	0
17	5	4	Y	35	25	22	14	3	5	0
18	5	4	Y	26	17	20	11	2	5	0
19	2	4	W	47	34	36	20	5	5	0
20	2.5	4	W	22	14	10	9	1	0	0
22	3	5	W	38	29	28	12	3	5	5

다. 기능성(고함량 vitamin, carotenoids) 중소구형 F1 품종 육성

(1) 가을용 중소구형 배추 개발을 위한 다양한 유전자원 수집 및 평가

국내 및 중국 시판종 중소구형 배추 13점과 기 보유한 조합 등을 2011년 9월 7일에 파종하여 9월 26일에 하우스 포장에 정식하여 특성을 조사하고 선발하였다(그림 3-2, 표 3-6). 교배조합 No.72, 75, 79를 보면, 우점 대비종 노랑쌈에 비해 성능이 떨어지지 않고 뿌리혹병에 내병성으로 조사되었다. 이들 양친(IL, S510, N1, HN1, S415)들을 이용하여 오렌지색 계통과 교배 후, 여교잡을 이용하여 뿌리혹병에 내병성이면서 내엽색이 오렌지색인 기능성 고품질 중소구형 배추를 육성하고자 하였다. 고정 및 분리 계통 선발은 2011년 12월 20일에 파종하여 2012년 1월 18일 정식한 후, 진행하였다.

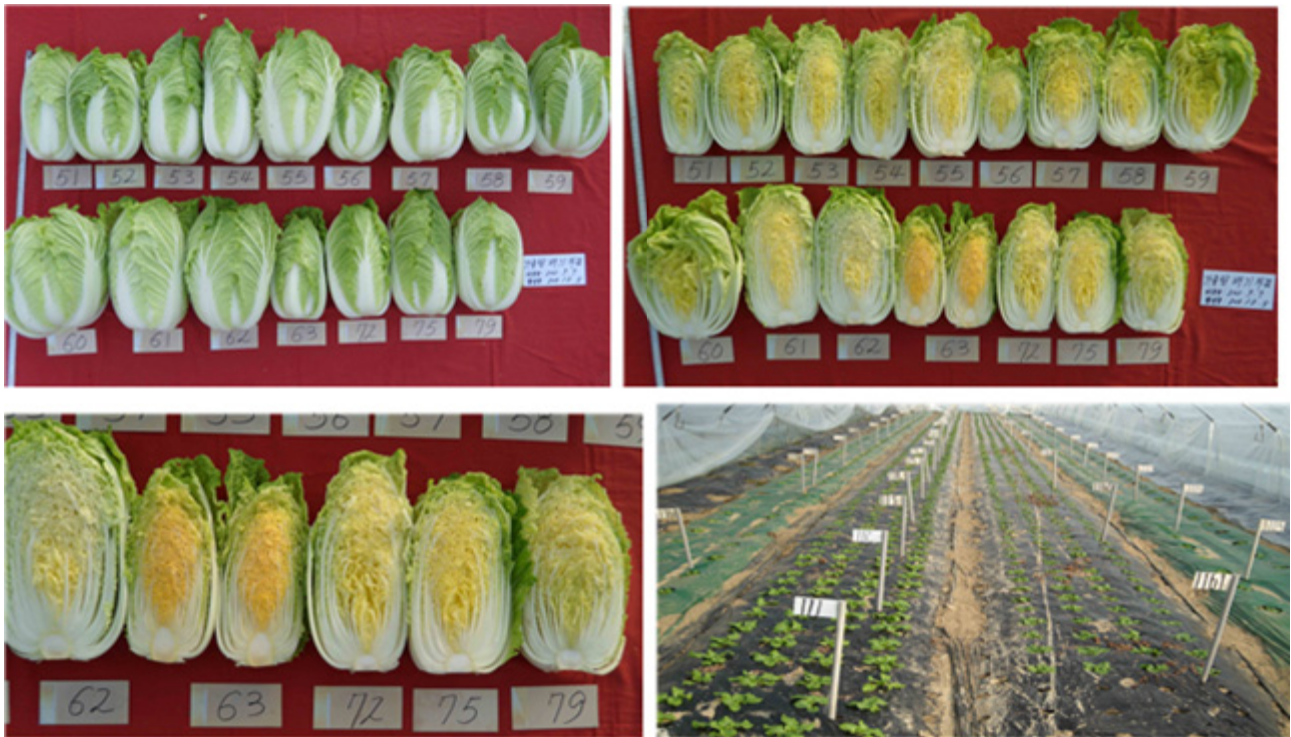


그림 3-2. 특성조사 및 고정/분리계통의 포장시험

표 3-6. 특성조사표

No.	품종명	회사명 (계통명)	외엽 색	내엽 색	엽장	엽폭	구고	구폭	구중	숙기	노균 병	뿌리 혹병
					cm	cm	cm	cm	g			
51	와와채	중국	농록	노랑	37	26	20	10	700	조	중	약
52	노랑쌈	사까다	농록	노랑	38	28	22	12	800	중	강	약
53	고향쌈	농우	농록	노랑	42	28	23	11	800	중	강	약
54	노랑미니	아시아	농록	노랑	39	29	23	11	700	중	중	약
55	고려금동이미니	다농	농록	노랑	39	28	24	13	800	중	강	약
56	CR미락쌈	사까다	농록	노랑	36	24	18	11	650	중조	강	강
57	춘광	사까다	농록	노랑	43	30	23	12	1000	중만	강	약
58	파워춘광	사까다	녹	노랑	43	28	19	12	700	중만	강	약
59	휘파람골드	사까다	농록	노랑	45	28	23	16	800	만	강	강
60	불암3호	세미니스	농록	노랑	45	30	24	17	800	만	강	약
61	CR농심	신젠타	농록	노랑	40	30	25	17	1200	중조	강	강
62	CR안심	신젠타	농록	흰	40	31	24	17	1100	중조	중강	강
63	금노랑만점	신젠타	농록	주황	34	23	20	10	600	중조	강	약
72	일춘xCR대노CR	IL x S510	농록	노랑	39	26	22	12	900	중	강	강
75	노일x신월하노CR	N1 x HN1	농록	노랑	39	28	22	12	800	중	강	강
79	일춘xCR대노CR탐영	IL x S415	농록	노랑	39	27	22	12	800	중	강	강

라. 카로티노이드 생합성 대사과정에 역할을 하는 유전자 검색 및 이를 이용한 STS (Sequence-Tagged Site) 마커 개발

(1) 배추 내엽의 카로티노이드 조성 및 함량 비교 분석

배추의 내엽색이 카로티노이드 생합성 경로(그림 3-3)중 어떤 물질의 축적으로 인한 표현형인지 알아보기 위해 오렌지색 배추와 일반 배추의 내엽을 동결건조하여 HPLC 분석으로 카로티노이드 함량을 분석하였다. 그 결과, 내엽이 오렌지색인 배추의 경우 beta-carotene의 함량이 9배 증가하였고, lutein과 violaxanthin은 각각 약 96%, 76% 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-4, 3-5). beta-carotene의 함량이 증가하면서 동시에 violaxanthin과 lutein의 함량이 감소하려면 생합성 경로 유전자 중 carotene hydroxylase b(CHXB)의 발현 감소가 있어야 할 것으로 생각되었다.

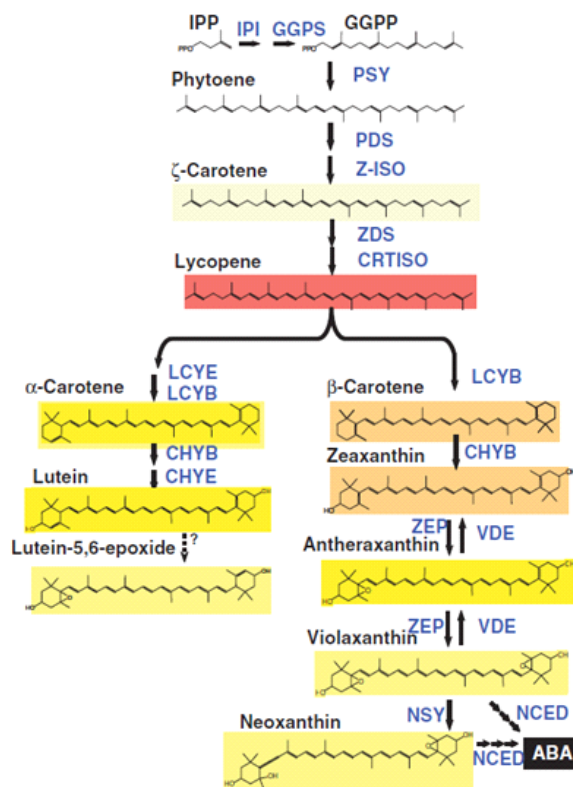


그림 3-3. 카로티노이드 생합성 경로

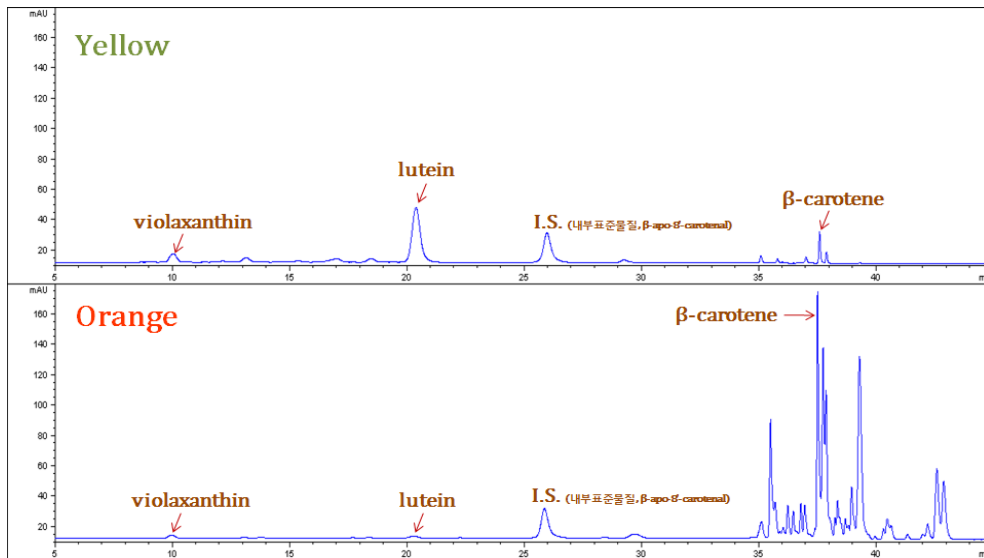


그림 3-4. 노란색 배추와 오렌지색 배추의 내엽의 카로티노이드 함량 분석 결과

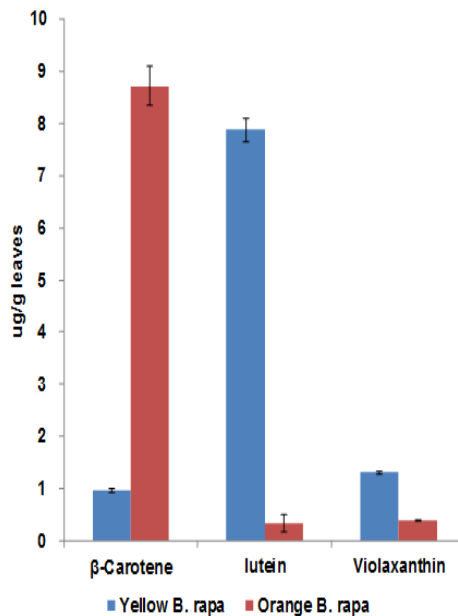


그림 3-5. 노란색 배추와 오렌지색 배추의 카로티노이드 함량 비교

(2) 카로티노이드 생합성 관련 유전자 탐색 및 유전자 서열상 변이 탐색

(가) 배추 지놈 내 카로티노이드 생합성 관련 유전자 탐색

배추 지놈 상에 carotene hydroxylase b(CHXB)가 어떻게 존재하는지를 배추 genome database(BRAD, <http://brassicadb.org/brad/>)를 통해 탐색한 결과, A01, A03, A10 chromosome에 총 3 copy가 존재하였으며 각각의 길이는 1,914 bp, 1,451 bp, 2,301 bp이었다. 각 유전자의 품종간의 염기서열 변이를 확인하고자, 이 3개의 유전자에 대해 untranslated region(UTR)과 gene 영역의 정보를 이용하여 총 20개의 primer를 제작하였다(표 3-7).

표 3-7. 배추 CHXB 유전자 분석을 위한 primer 리스트

primer name	Forward sequence	Reverse sequence	expected size
CHXB-A01-01	GTAAATGATTTGAGTGATTGCAT	TTTGCATACCCTCCGCTATT	487
CHXB-A01-02	AGTGACCAGATGACGACTTCC	TGATGTAGCTTTGTTCTCATTGC	481
CHXB-A01-03	GCAATGAGAACAAGCTACATCA	TTGGATTTTCGGTTCATGTG	485
CHXB-A01-04	TCACATGAACCGAAAATCCA	GGCACGCTTCTTTATGGAAC	498
CHXB-A01-05	CCATAAAGAAGCGTGCCAGA	AAGCTCTCTGGACACGAACG	483
CHXB-A01-06	GAGTACTCCGCTCTATGG	CACCAAATGCAAAGAGGACA	575
CHXB-A03-01	GGTCTCTCAACCACCGTAACA	GCACCAACAGAGAGTGCAAA	507
CHXB-A03-02	CCCAATGTCAGAGATGTTTGG	TCCTTTTAGCATAGTTGTTGTGA	489
CHXB-A03-03	AAAGGACTCGTCCTGGTCT	TATAGGCGATCCCAAACACC	507
CHXB-A03-04	AATAACGGTGTTTGGGATCG	CCTCCAACCTTCCAATTCC	531
CHXB-A03-05	AACTGGTGATTCTAGGAATTGGA	CTCGCCTTGTTCAATTCACCTG	350
CHXB-A10-01	CCATCACAAATTTTCGGTTCA	TTTTCATTTTGGCTAATTATTTTGT	521
CHXB-A10-02	CAAAATAATTAGCCAAAATGAAAAA	CGAAGCTCGACATCATAGCA	559
CHXB-A10-03	ATGTCGAGCTTCGGCATTAC	AAGAAGACCAATCGCAGGAA	566
CHXB-A10-04	CGATTGGTCTTCTTACTATGGA	TGTATACAATTCGCATGGTTAGAGT	555
CHXB-A10-05	AATTCATTGACCTGCGGTTT	AGGTTGTGCTTTGGTTTTGG	352
CHXB-A10-06	CCAAAACCAAAGCACAACT	AGCTCAATCTGTATATATTGGTTTC	303
CHXB-A10-07	TGAAACCAATATATACAGAGATTGAGC	GAAAAGACAAC TAGACCGTTGGA	439
CHXB-A10-08	TCCAACGGTCTAGTTGTCTTTTC	TTTAAAGCCCGGATTACC	477
CHXB-A10-09	TTTTCAATTGCAATGGGTGA	TTCGTTAACCAATTCCGTTTTT	376

이 primer들을 이용하여 7개 개체(모부분으로 사용한 개체 4개, 노란색 배추 2개, 오렌지색 배추 2개)들에 대해 genomic DNA PCR 분석이 이루어졌으며, PCR 산물은 6% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)로 분리함으로써, 오렌지색 배추와 노란색 배추 사이의 염기서열 polymorphism 여부를 확인하였다. 그 결과, 대부분의 밴드는 length polymorphism을 보이지 않았으며 내염색 표현형과 연관된 밴드 패턴 역시 발견할 수 없었다(그림 3-6, 3-7, 3-8).

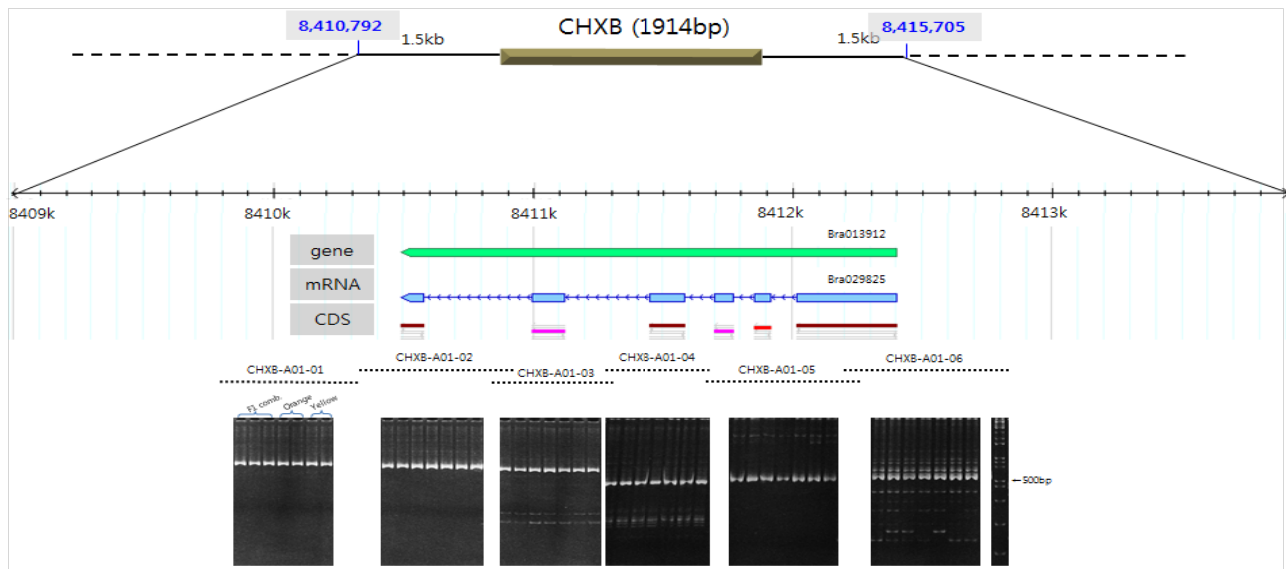


그림 3-6. A01 chromosome에 위치한 carotene-hydroxylase-b 유전자의 genomic DNA PCR 결과

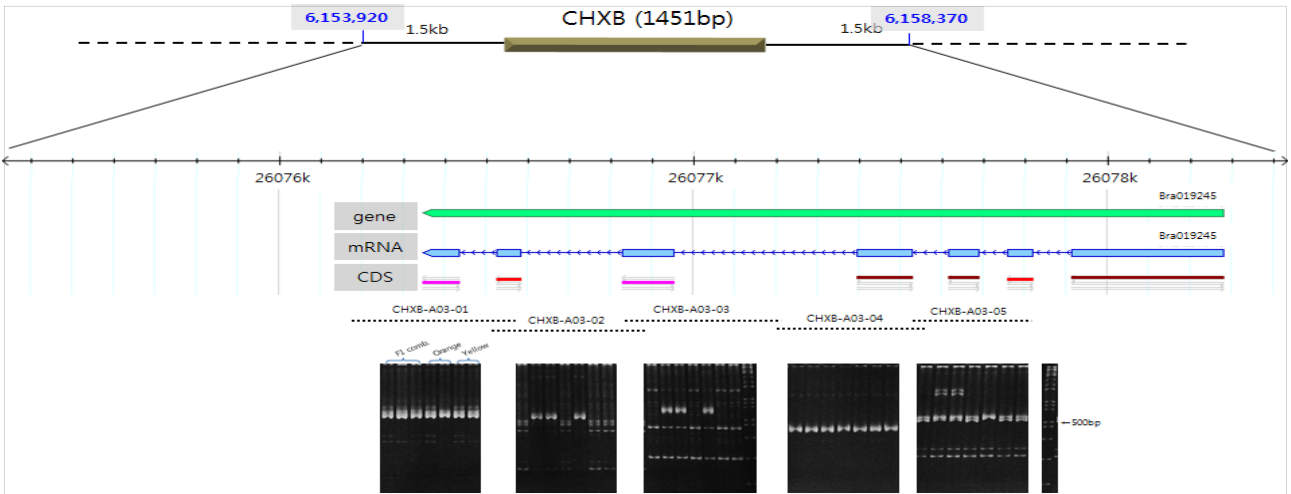


그림 3-7. A03 chromosome에 위치한 carotene-hydroxylase-b 전자의 genomic DNA PCR 결과

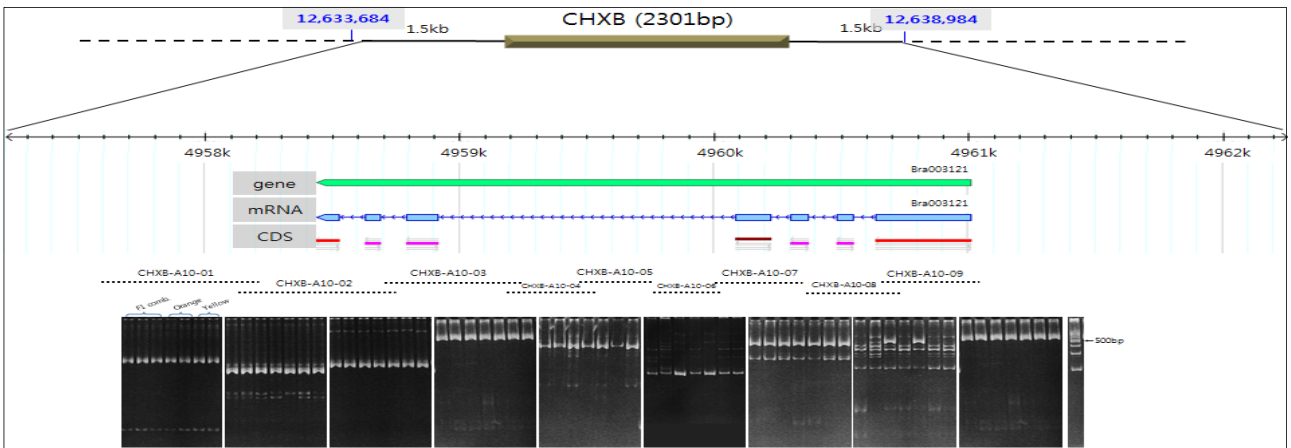


그림 3-8. A10 chromosome에 위치한 carotene-hydroxylase-b 전자의 genomic DNA PCR 결과

(3) 오렌지색 배추에 *Or* gene marker 적용 및 후보 유전자 탐색

(가) *Or* gene marker 적용

Feng et al (2010) 는 배추에서 *Or* gene으로 예상되는 유전자와 인접한 분자 marker 2개(syau15 and syau19)를 개발하였다고 보고하였다(표 3-8).

표 3-8. syau15, syau19 primer 정보

primer name	Foward sequence	Reverse sequence	Map distance(cM)
syau19	CCGAAGCCAGATTAGGAG	GCCCATGCCTACGAATGATAT	1.3
syau15	CGTGATTACGCCTTCCAATAT	TGTGACAGCGGCAGAAAATAG	3.3

이 marker 정보를 이용하여 2개 marker 사이에 어떤 유전자가 존재하는 지를 BRAD에서 확인한 결과, A09 chromosome상의 35,723,892 ~ 36,314,441 bp의 약 600 kb 구간 사이에 총 913개의 유전자가 존재하였으며 (그림 3-9), 이 중 두 개 (phytoene desaturase (PDS), carotene isomerase (CRTISO))가 카로티노이드 생합성 경로에서 그 기능을 할 것으로 예상되었다(그림 3-10).

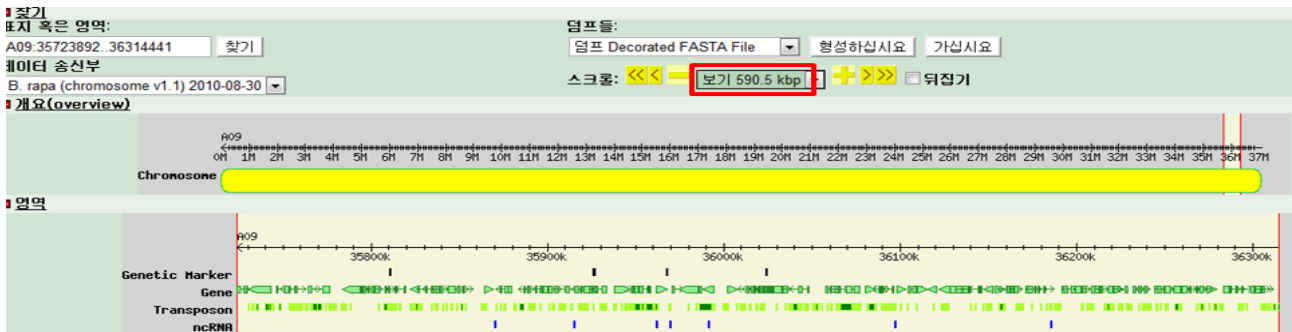
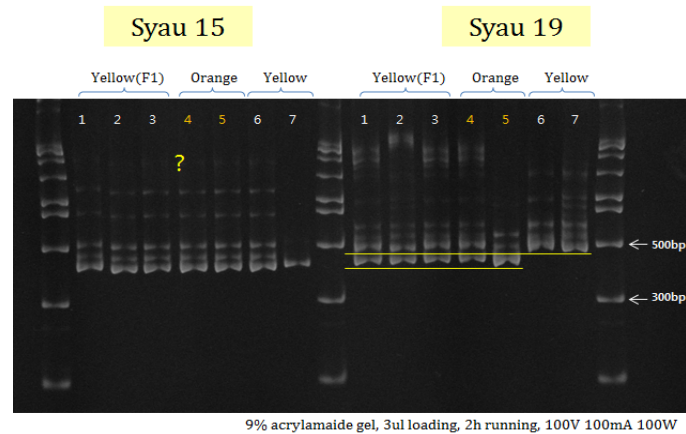


그림 3-9. syau15와 syau19 marker 의 배추 A09 chromosome상의 위치 및 거리



그림 3-10. syau15와 syau19 사이에 존재하는 카로티노이드 생합성 관련 유전자

두 marker를 오렌지배추 분석에 적용해 본 결과, syau19 marker genomic DNA PCR 분석에서 완벽하지는 않지만 오렌지색 배추와 노란색 배추사이에서 length polymorphism을 확인할 수 있었다(그림 3-11).



9% acrylamide gel, 3ul loading, 2h running, 100V 100mA 100W

그림 3-11. 모부분 및 F1 개체에 syau15와 syau19 marker 분석

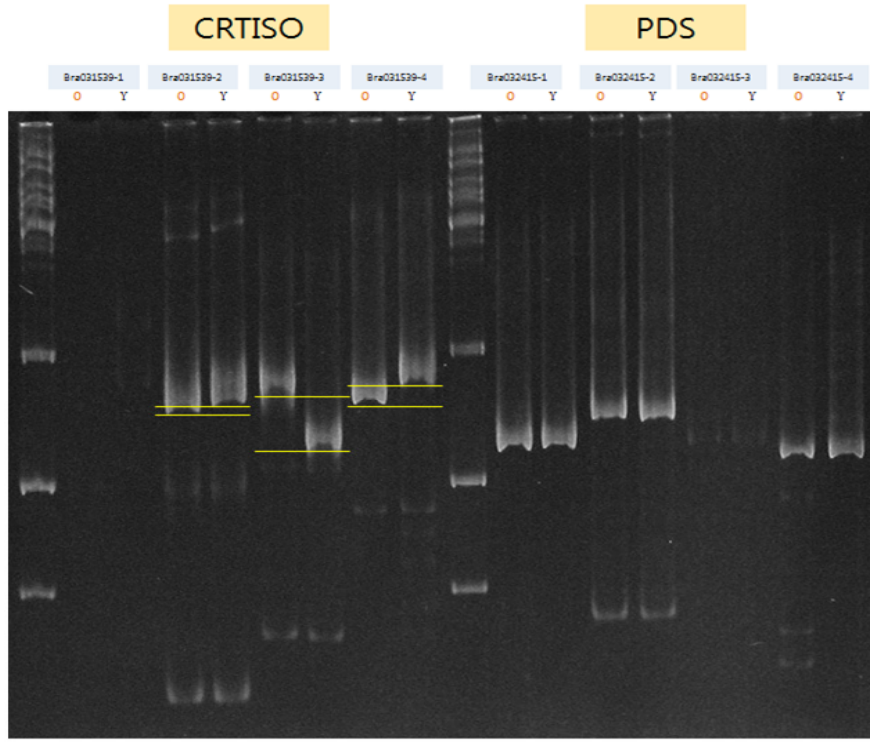
(나) *Or* gene marker 에 인접한 카로티노이드 생합성 관련 유전자 분석

Or gene marker 사이에 존재했던 카로티노이드 생합성 관련 유전자인 PDS와 CRTISO를 분석하기 위해서 총 8쌍의 primer를 제작하였다(표 3-9).

표 3-9. PDS와 CRTISO 유전자 분석용 primer 정보

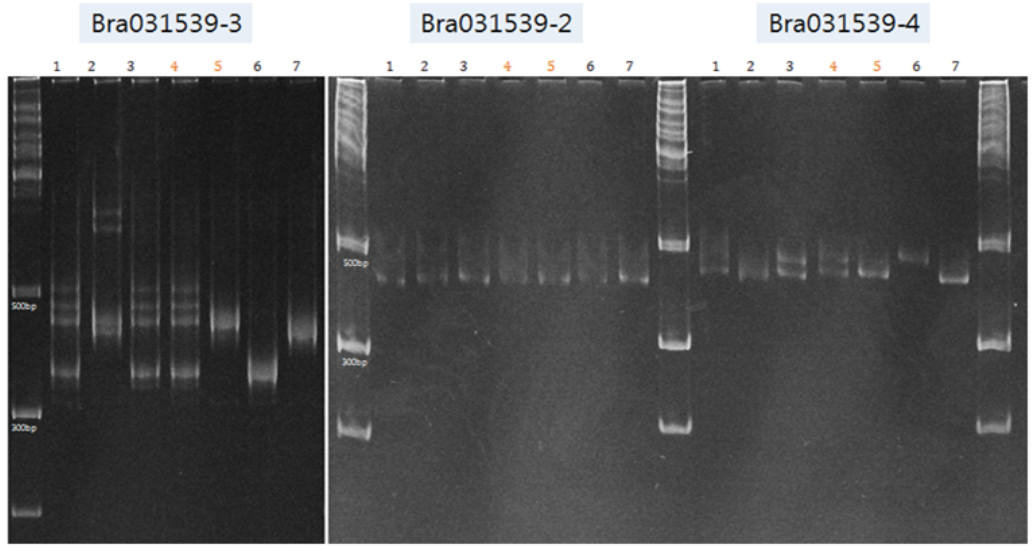
primer name	Forward sequence	Reverse sequence
Bra031539-1	TCCACCCCTAGGGTGAACCTCA	TCCGTTGGGCTTCCTGTAGCC
Bra031539-2	GGCTACAGGAAGGCCAACGG	AACCGGAGCTCCACCAGGG
Bra031539-3	TCCCTGGTGGGAGCTCCGGT	TCCCTTCCTTCGTGCGGAAAC
Bra031539-4	TCCGCACGAGAAGGAAGGGA	CCCACCAACACCACCAACAGGG
Bra032415-1	GGAATGTGGCGTGAAGCGCA	TGGTGCTGGTTGGCCTGACT
Bra032415-2	GTCAGGCCAACCCAGCACCAAG	TACGCCGAGTCCGTGCGAAG
Bra032415-3	TCGCACGGACTCGGCGTAAG	TCAAACCTCCAACGCCGCT
Bra032415-4	ACTTCATGCCTTCTCCTCCGCCTA	ATTGGGTGTTGCTTACATCTTTTCGTTGG

우선, 카로티노이드 HPLC 분석에 이용했던 오렌지색 배추와 노란색 배추의 동결 건조 내엽 시료로부터 genomic DNA를 추출하여 분석하였다. 그 결과, CRTISO 유전자 분석용 primer중 일부 (Bra031539-2, -3, -4 primer sets)에서 오렌지색 배추와 노란색 배추간 length polymorphism를 확인할 수 있었다(그림 3-12). 따라서 이들 primer set을 모부분 및 F1 분석으로 확대하였으나 확실한 결과를 얻지는 못하였다(그림 3-13).



6% acryl. 1.5ul loading 1h 40m running PCR annealing tm. 60
 O : Orange inner leaves, Y : Yellow inner leaves, Blue box : primer name

그림 3-12. PDS와 CRTISO 분석용 primer를 이용한 genomic DNA PCR 분석



6% acryl. 1.5ul loading 1h 40m running 100V 100mA 100W
 Blue box : primer name, Numbers : 1~3 : F1 개체, 4~5 : orange 모본, 6~7 : yellow 부분

그림 3-13. CRTISO 분석용 primer를 이용한 genomic DNA PCR 분석

마. 오렌지 배추의 내엽색 변화 조사

* 제2-2세부 “기능성 중소구형 배추 품종 및 분자표지 개발” 연구가 과제평가후, 제2-1-2세부과제로 변경되었음.

결구 후의 오렌지 배추와 일반 배추의 내엽색을 조사하기 위해서, 노지에서 봄과 가을동안 결구된 배추를 절단하여 내엽색의 차이를 비교 관찰하였다. 오렌지 배추는 일반 배추에 비해서 조금 더 진한 노란색의 내엽색을 가지고 있으며, 특히 절단 후 햇볕에 노출 시 오렌지 배추의 내엽색이 오렌지색 또는 적색으로 변하는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-14). 오렌지 배추의 내엽에 다양한 처리를 한 후 색의 변화를 관찰한 결과, UV 조사에 의해 오렌지색으로 변화가 급격히 일어남을 알 수 있었다. 또한 춘화 처리 후 개화된 꽃잎의 색도 오렌지 배추와 일반 배추간에 차이가 있음을 확인하였다(그림 3-14). 오렌지 배추와 일반 배추의 교잡을 통해서 육성된 F2 집단의 분리비를 조사한 결과, 1:3의 비율(오렌지:일반)로 분리됨을 확인하였다(표 3-10). 이를 통해 오렌지색 표현형이 단일열성유전자에 의해 조절되는 형질이라 판단할 수 있었다. 이는 추가적인 F3 집단의 분리비 조사에 의해서도 재확인되었다(표 3-11).



그림 3-14. Representative phenotypes of YE and OC cultivars. The YE cultivar (a, b, and c) has yellow inner leaves (a) and flowers (c), whereas the OC cultivar (d, e, and f) has deep yellow (orange) inner leaves (d) and pale-yellow flowers (f). After sunlight exposure for 5 min (b, e, and h), inner leaf color of the OC cultivar changed to orange (e) but no change was observed in the YE cultivar (b). The Orange queen cultivar showed the same color phenotypes as the OC cultivar both before (g) and after (h) sunlight exposure.

표 3-10. Segregation of flower color in F2 population

Flower color	Pale yellow (OC)	Yellow (YE)	Total F2 plants
No. of Plants	176	560	736
Ratio	1	3.1	-

표 3-11. Segregation of flower color in F3 population

F2 no.	F3 no.	Pale yellow (OC)	separated (YE+OC)	Yellow (YE)
6004	BN401-463	9	34	17
6005	BN501-568	19	29	18
6006	BN601-752	33	71	44
Total	274	61	134	79

바. 오렌지 배추의 카로티노이드 함량 및 조성 조사

HPLC 분석을 통해 오렌지 배추와 일반 배추의 내엽에서의 카로티노이드 조성 및 함량을 조사하였다(그림 3-15). lutein 관련 peak(peak no. 1)는 오렌지 배추와 일반 배추의 내엽 모두에서 확인이 되었으나 다른 lutein 관련 peak(peak no. 2)는 일반배추에서만 관찰되었다. 이외의 다른 카로티노이드 관련 peak들은 오렌지배추 내엽에서만 관찰이 되었다. 특히 오렌지 배추 내엽은 all-trans-lycopene(lycopene) 및 이의 isomers를 많이 축적하고 있었다. 오렌지 배추 내엽에서의 prolycopene과 lycopene의 함량은 각각 건조된 1g의 내엽당 38.8(+0.9)µg 및 14.1(+0.8)µg이었다. 이것은 오렌지 배추 내엽이 lycopene-like compound를 주된 카로티노이드 성분으로 가지고 있음을 의미하며, 이것은 lutein을 주된 성분으로 가지는 일반 배추와는 확연히 다른 것이었다. 최근 Watanabe et al (2011)은 ‘오렌지 퀴’이라는 오렌지 배추의 일본품종의 잎 전체에서 카로티노이드 함량 분석을 수행한 결과 ‘오렌지 퀴’ 품종은 일반 배추에는 없는 prolycopene을 함유하고 있음을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 오렌지 배추 역시 prolycopene를 축적하고 있으며, 이로 인해서 lycopene 함량도 동반해서 증가된 것으로 추측할 수 있었다.

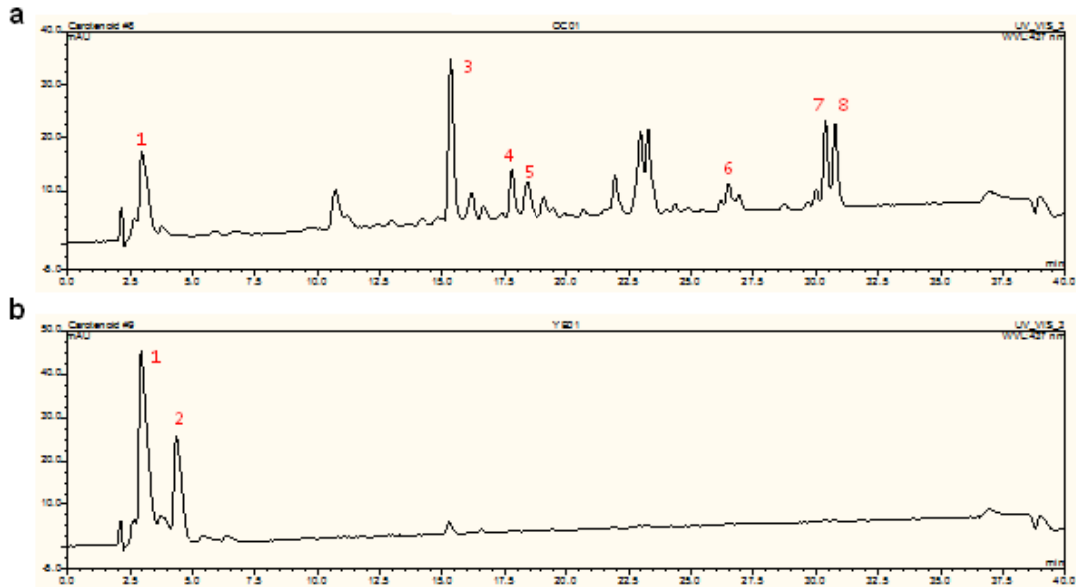


그림 3-15 HPLC chromatogram of carotenoid extracts from inner leavers. Carotenoids extracted from inner leaves of OC (a) and YE (b) cultivars were analyzed using HPLC and each carotenoid pigment was detected at the wavelength of 437 nm. The peaks correspond to the following: 1, 13 or 15Z-lutein; 2, all-*trans*-lutein; 3, prolycopene; 4 and 5, 1'-OH- γ -carotene and its isomer; 6, 5Z, 9Z- or 5Z, 9'Z-lycopene; 7, all-*trans*-lycopene (lycopene); 8, 5Z-lycopene. Other peaks without number correspond to unknown compounds.

사. 배추의 카로티노이드 생합성 관련 유전자 발굴

오렌지 배추가 가지고 있는 카로티노이드 생합성 경로에 관여하는 유전자중 어떤 유전자에 변이가 일어났는지 조사하기 위해서, 우선 배추 카로티노이드 생합성에 관여하는 유전자 전체를 조사하였다. 이미 알려진 애기장대 카로티노이드 생합성 유전자 16개의 서열(Ruiz-Sola and Rodríguez-Concepción, 2012)을 이용하여 배추 상동 유전자를 배추 genome database (<http://brassicadb.org/brad/>; BRAD; Cheng et al., 2011; Wang et al., 2011)에서 분석한 결과 최종적으로 21개의 배추 유전자를 발굴할 수 있었다(표 3-12). 16개의 애기장대 유전자 중, *CCR2/CRTISO*(At1g06820)는 carotenoid isomerase(CRTISO)를 암호화하는 유전자로, 본 유전자가 knock-out된 애기장대 돌연변이체는 prolycopene 및 lycopene isomer들을 축적하는 것으로 보고되어 있다(Park et al., 2002). *CRTISO* 유전자 변이로 인한 prolycopene 축적은 토마토 *tangerine* mutant에서도 확인되었다(Isacson et al., 2002). 따라서 본 연구의 오렌지 배추 역시 *CRTISO* 유전자 변이로 인한 내염색 변화 및 prolycopene 축적 표현형을 보이는 것으로 추측할 수 있었다. 배추의 카로티노이드 생합성에 관여하는 21개 유전자중 CRTISO를 암호화하는 유전자는 2개(Bra031539, Bra027908)가 존재하였으며, Bra031539를 *BrCRTISO1*, Bra027908를 *BrCRTISO2* 유전자로 각각 명명하였다. BRAD 정보를 토대로 두 유전자의 배추 염색체 상의 위치를 확인한 결과, 염색체 A09의 macrosyteny block A와 D에 각각 존재함을 알 수 있었다(그림 3-16). 특히

BrCRTISO1 유전자는 기존에 배추 오렌지 내염색 연관 marker로 보고된 2개의 SSR markers (syau15 and syau19)(Feng et al., 2010)사이에 존재하였다. 이는 *BrCRTISO1* 유전자가 오렌지 배추 표현형을 나타내게 하는 강력한 원인 유전자임을 알 수 있게 하였다.

표 3-12. Identification of *B. rapa* *CRTISO* genes by comparative genomics

<i>Brassica rapa</i> (based on BRAD)			<i>Arabidopsis thaliana</i> (based on TAIR10)			
LF	MF1	MF2	Accession	Gene	Protein	Macro-synteny block
Bra008569	Bra006391	Bra023603	At5g17230	<i>PSY</i>	<i>PSY</i>	<i>R</i>
-	Bra032770	Bra010751	At4g14210	<i>PDS3</i>	<i>PDS</i>	<i>T</i>
-	Bra040411	-	At3g04870	<i>ZDS</i>	<i>ZDS</i>	<i>F</i>
Bra019899	-	-	At1g10830	<i>ZIC1</i>	<i>Z ISO</i>	<i>A</i>
-	Bra031539	-	At1g06820	<i>CCR2/CRTISO</i>	<i>CRTISO1</i>	<i>A</i>
Bra027908	-	-	At1g57770	<i>CRTISO2</i>	<i>CRTISO2</i>	<i>D</i>
Bra029825	-	-	At3g10230	<i>LYC</i>	<i>LCYB</i>	<i>F</i>
Bra002769	-	Bra006838	At5g57030	<i>LUT2</i>	<i>LCYE</i>	<i>W</i>
Bra013912	Bra019145	-	At4g25700	<i>BCH1/CHY1</i>	<i>BCH1</i>	<i>U</i>
Bra003121	-	-	At5g52570	<i>BCH2/CHY2</i>	<i>BCH2</i>	<i>W</i>
-	-	Bra038437	At1g31800	<i>LUT5</i>	<i>CYP97A3</i>	<i>B</i>
-	-	Bra038092	At4g15110	<i>CYP97B3</i>	<i>CYP97B3</i>	<i>T</i>
-	-	-	At3g53130	<i>LUT1</i>	<i>CYP97C1</i>	<i>N</i>
Bra012127	Bra037130	-	At5g67030	<i>ABA1/NPQ2</i>	<i>ZEP</i>	<i>X</i>
Bra018616	-	-	At1g08550	<i>NPQ1</i>	<i>VDE</i>	<i>A</i>
-	Bra034026	-	At1g67080	<i>ABA4</i>	<i>NSY</i>	<i>E</i>
21 genes			Total	16 genes		

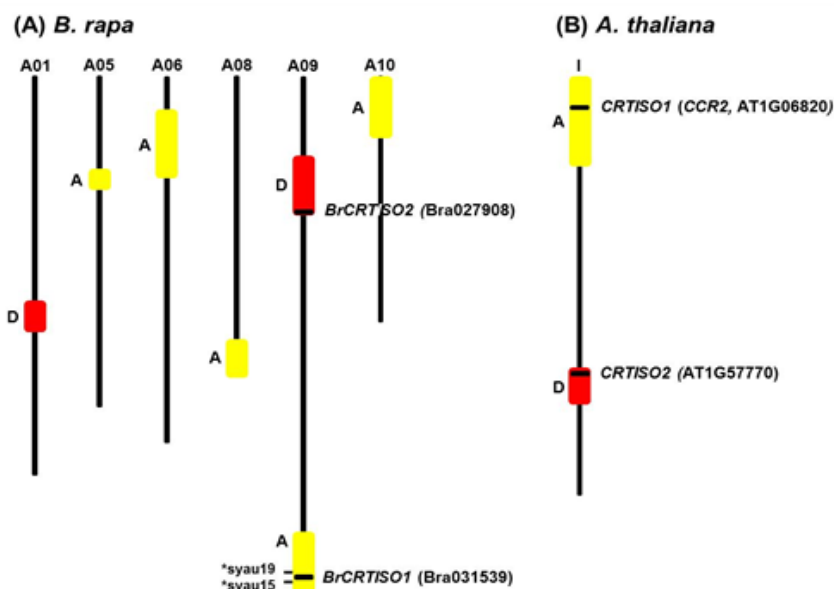


그림 3-16. Chromosomal location of *CRTISO* genes in *B. rapa* (A) and *A. thaliana* (B). The location of genes in both species was determined in BRAD and TAIR database and marked with black line with gene name on chromosome depicted as vertical line. Genome block showing macrosynteny between genomes of both species is

drawn with vertical bar in same color, based on the report of Wang et al (2011). Block D on chromosome A09 is considered to be duplicated internally.

아. *BrCRTISO* 유전자 발현 분석

배추에 존재하는 *BrCRTISO* 유전자의 발현을 배추 microarray database 검색과 RT-PCR 분석을 통해서 확인하였다. 우선 배추 microarray database 조사를 통해서, 두 유전자 모두 배추 전 생육기간동안 높은 발현 수준을 유지하는 유전자임을 확인할 수 있었으며, 특히 *BrCRTISO1* 발현은 *BrCRTISO2* 보다 월등히 높게 발현하고 있음을 알 수 있었다(그림 3-17). 오렌지 배추와 일반 배추로부터의 total RNA를 분리하여 RT-PCR 분석을 실시한 결과, *BrCRTISO1* 발현을 오렌지 배추에서는 확인할 수 없었으며(그림 3-18a), 특히 *BrCRTISO1* 유전자의 내부 exon에 특이적인 프라이머를 이용해서 RT-PCR 분석을 수행한 결과 exon 9번에서 exon 13번 사이에 변이가 있음을 추측할 수 있었다(그림 3-18b).

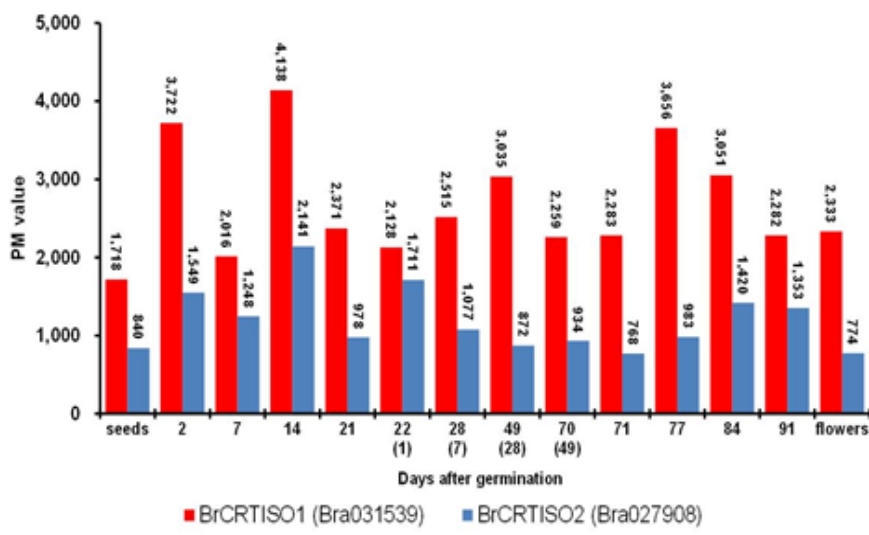


그림 3-17. The expressions level of *BrCRTISO1* and *BrCRTISO2* during development from seed through flowering according to 24K microarray analysis. The perfect match (PM) values for *BrCRTISO* genes were retrieved from the *B. rapa* microarray database and used to determine expression patterns. Numbers at the bottom indicate days after germination. Numbers in parentheses indicate days after cold (4°C) treatment for vernalization. PM values are shown at the tops of the bars. Microarray probe IDs for *BrCRTISO1* and *BrCRTISO2* are BRAS0001S00018473 and BRAS0001S00014836, respectively. The *B. rapa* 24K oligo microarray database provides only averaged PM values of repeated microarray experiments after statistical analysis (Lee et al., 2008), and therefore standard error or deviation was not calculated in this study.

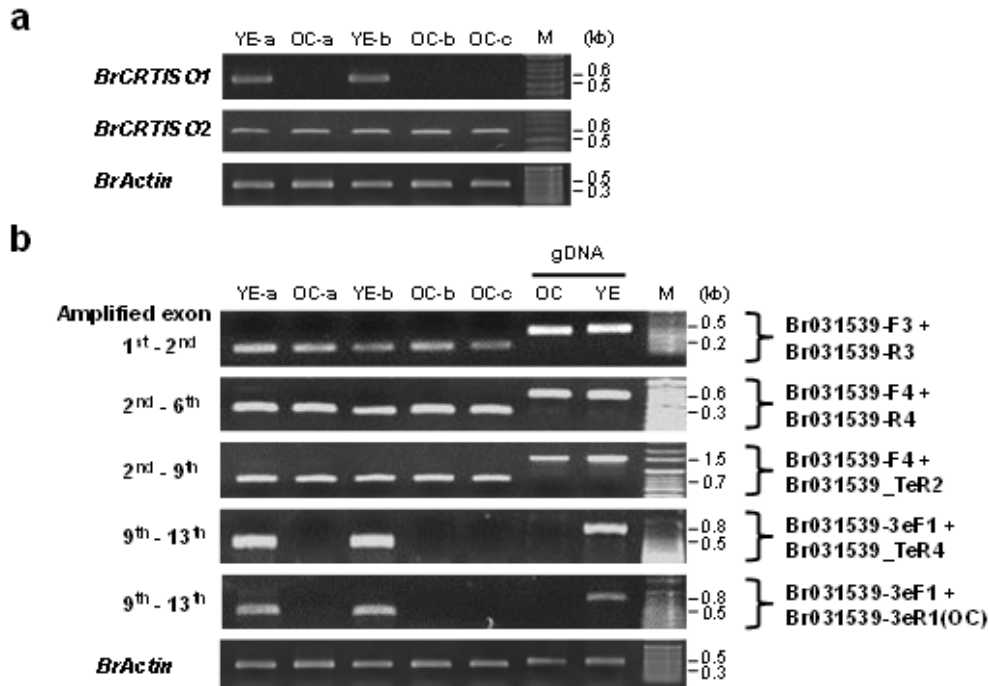


그림 3-18. RT-PCR analyses of the *BrCRTISO* genes in OC and YE cultivars. Among the F₂ progeny established by crossing between parental YE and OC inbred lines, two YE plants, YE-a and YE-b, and three OC plants, OC-a, OC-b, and OC-c, were used for this RT-PCR analysis. Total RNAs were isolated from leaves and their synthesized cDNA templates were used for RT-PCR analysis. (a) RT-PCR analysis of the *BrCRTISO1* and *BrCRTISO2* genes using primers specific to the 3' end of each gene. (b) RT-PCR analysis of *BrCRTISO1* using primers specific to each exon sequence. Numbers on the left side indicate exon regions amplified by PCR. Three primer sets, Bra031539-F3 and Bra031539-R3, Bra031539-F4 and Bra031539-R4, and Bra031539-F4 and Bra031539_TeR2, common to both *BrCRTISO1* sequences of OC and YE were used for amplification of the 1st to 9th exons. For the 9th to 13th exons, two primer sets, Bra031539-F4 and Bra031539_TeR4 specific to the YE *BrCRTISO1* sequence, and Bra031539-F4 and Bra031539-3eR1(OC) specific to the OC *BrCRTISO1* sequence, were used. PCR results using a primer set, Bra031539-F4 and Bra031539-3eR1 specific to YE *BrCRTISO1*, were omitted because the set generated the same results as those of the last two primer sets and Fig. 3a. Genomic DNAs from parental YE and OC inbred lines were also used as genomic DNA templates. The observed size of cDNA and genomic DNA amplicons in agarose gels matched the expected sizes based on the *BrCRTISO1* genomic sequence. *BrActin* was used as a PCR control. M indicates 100bp DNA size marker, and sizes (kb) of marker bands close to amplicons are shown on the right side of the gel.

자. *BrCRTISO1* 유전자의 genomic DNA-PCR 분석

오렌지 배추의 *BrCRTISO1* 유전자의 RT-PCR 분석시, 오렌지 배추에서만 증폭하지 않았

던 프라이머 세트를 이용해서 화색을 기준으로 오렌지 배추와 일반 배추로 선별된 F2 8개 개체와 모부본 및 F1 개체를 분석하였다. 추출한 genomic DNA를 이용하여 PCR를 수행한 결과, PCR product가 일반 배추에서만 증폭되고, 오렌지 배추에서는 증폭되지 않음을 확인 할 수 있었다(그림 3-19). 이 결과로부터 오렌지 배추의 진한 노란색 내엽과 prolycopene 축적의 원인은 *BrCRTISO1* 유전자의 변이와 연관되어 있음을 재확인할 수 있었다.

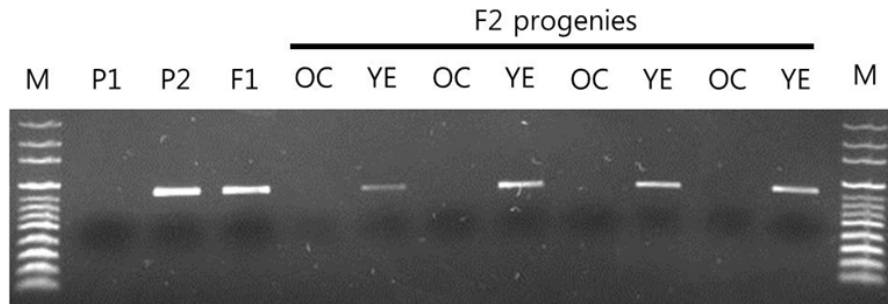


그림 3-19. Genomic DNA PCR analysis of *BrCRTISO1* in parents, F1 and F2 plants. F2 plants were generated by selfing of F1 plants from crossing OC and YE inbred lines, as mentioned in Materials and Methods. Phenotype of the F2 plants was determined based on flower color and then 8 plants were randomly selected and used for genomic DNA PCR analysis with primer set specific to 3' terminus of *BrCRTISO1*. M and numbers indicate 100 bp DNA ladder and progeny no. respectively. Electrophoresis was performed with PCR reaction of 31 cycles.

차. *BrCRTISO1* 유전자의 염기서열 변이 분석

약 3.5 kb의 *BrCRTISO1* 유전자 지역을 포함하는 genomic DNA의 염기서열을 조사하여, 오렌지 배추와 일반 배추 *BrCRTISO1* 유전자간의 변이를 분석하였다. 오렌지 배추의 *BrCRTISO1* 염기서열은 일반 배추의 *BrCRTISO1*의 염기서열과 비교했을 때, 다수의 SNP 및 InDel 지역을 가지고 있었다. 대부분의 변이가 intron 지역에 집중하여 존재했지만, 특이하게 첫번째 exon은 상당히 큰 InDel 변이와 다수의 SNP를 가지고 있었다(그림 3-20, 3-21). 이런 변이로 인해서 일반 배추의 *BrCRTISO1* 유전자가 589 amino acid residue를 암호화하는 반면에 오렌지 배추의 *BrCRTISO1* 유전자는 2 amino acid residue가 소실된 587 residue를 암호화하였고, 또한 19 residues가 유전자 염기서열 상의 SNP 때문에 다른 amino acid residue로 치환될 가능성이 있음을 확인하였다. 또한 일반 배추에서만 PCR product를 증폭했던 *BrCRTISO1* 프라이머 세트의 reverse 프라이머인 Bra031539-3eR1 (5'-CGCTCTCATGGACTTGAGCAACA-3')의 서열상에 두 개의 SNP가 있음을 확인하였다.

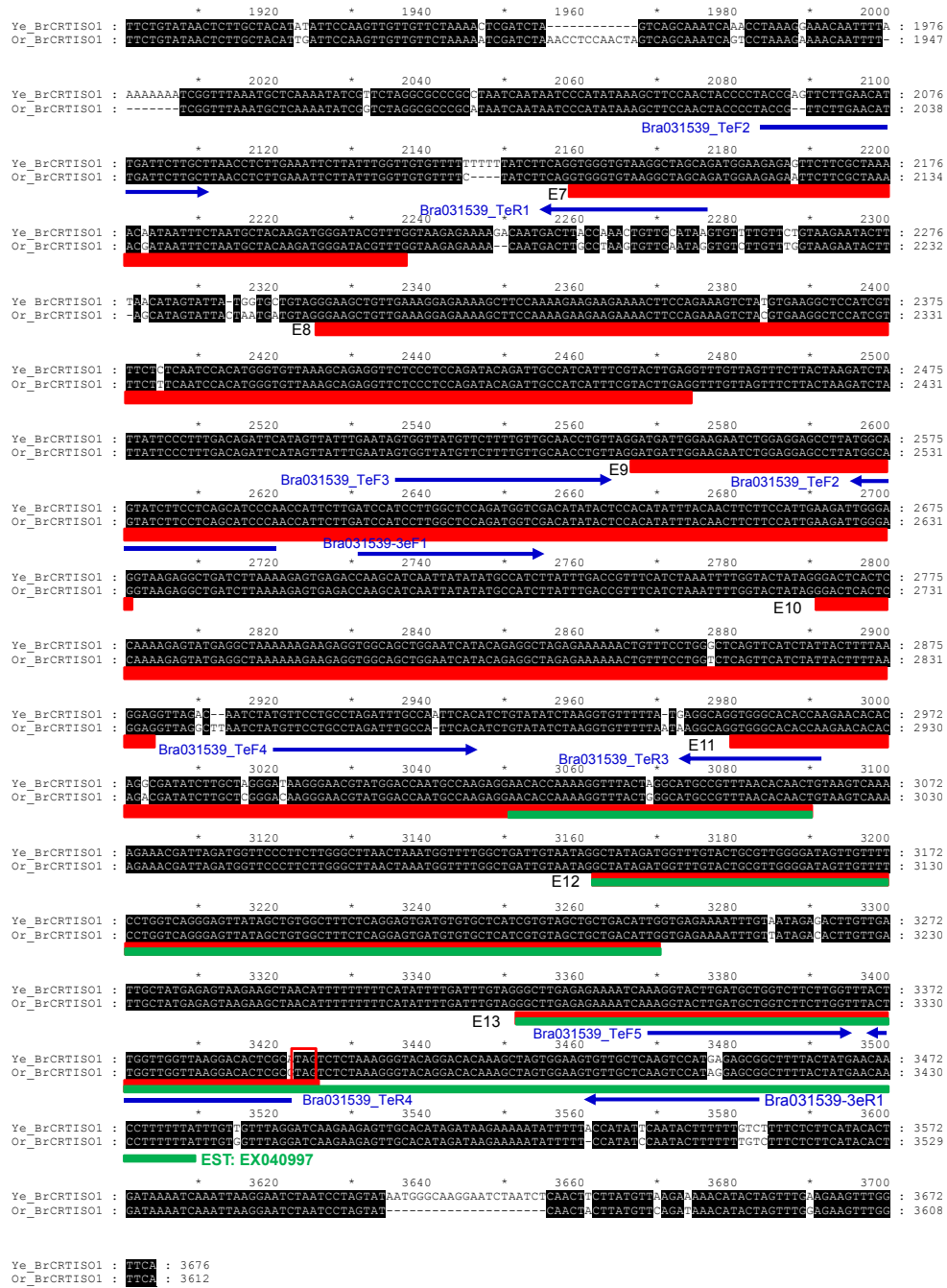


그림 3-20. Sequence alignment of the *BrCRTIS01* from OC and YE cultivars. Red and green boxes indicate exons (E1 to E13) predicted based on BRAD information and 3' terminal region matching EST sequence (EX040997), respectively. Arrows indicate the location of primers used for RT-PCR and genomic DNA PCR analysis. The start codon and stop codon are marked by rectangles with red line. The alignment was made using ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) and GeneDoc software.

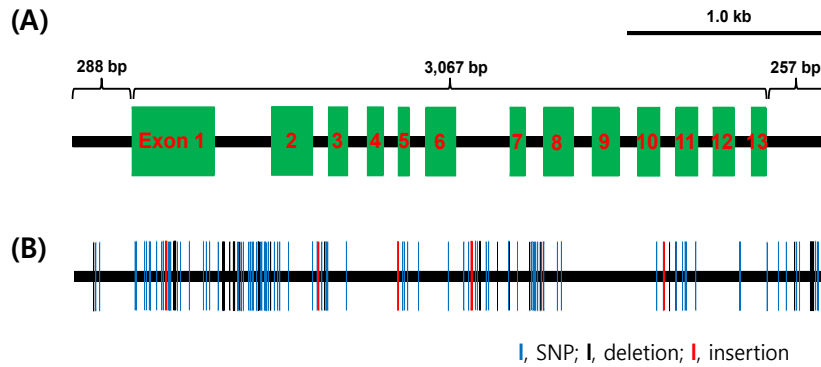


그림 3-21. Sequence variation of *BrCRTISO1* sequence in OC cultivar. (A) Structure of 3.5 kb *BrCRTISO1* sequence obtained from OC cultivar. After sequencing and assembly of genomic DNA fragments covering *BrCRTISO1* genes, its exon and intron were predicted based on BRAD information. (B) SNPs and InDels found in *BrCRTISO1* sequence of OC cultivar. Sequence variation was determined by comparison of sequence of OC cultivar with that of YE cultivar.

카. 오렌지 내염 연관 분자 마커 설계 및 검정

오렌지 배추의 진한 노란색 내염 및 polycopene 축적과 연관된 분자 마커를 개발하기 위해 앞서 확인된 오렌지 배추와 일반 배추 *BrCRTISO1* 유전자간의 차이나는 염기서열을 이용하였다. 최종적으로 오렌지 배추와 일반 배추 *BrCRTISO1* 서열에 특이적인 각각의 프라이머 한쌍씩과 두 배추에 co-dominant한 한쌍의 프라이머 세트를 설계하였다(표 3-13).

표 3-13. List of primers used as molecular markers

Primer name	Sequence (5' → 3')	Specificity	Marker ID
Bra031539-OC_MF1	GAGGTCTGTTTCTACGAGTACGG	OC unique	M1
Bra031539-OC_MR1	CTCATTAGTCCATCTCCGACCA		
Bra031539-3eF1	ATCCATCCTTGGCTCCAGATGGTTCG	YE unique	M2
Bra031539-3eR1	CGCTCTCATGGACTTGAGCAACA		
Bra031539-F3	TCCCTGGTGGGAGCTCCGGT	co-dominant	M3
Bra031539-R3	TCCCTTCCTTCTCGTGCGGAAAC		

모부분, F1, F2 세대의 식물체를 이용하여 설계된 분자 마커를 검정한 결과, 관찰된 내염 색과 연관된 특이적 PCR product를 생성하였다(그림 3-22). 분자 마커중 co-dominant 마커는 오렌지배추에서는 510 bp의 단일 product를 생성하였지만, 일반배추에서는 550 bp와 490 bp의 2개의 product를 생성하였다. 염기서열 분석 결과, 일반 배추의 *BrCRTISO1* allele type에는 2 가지 형태가 있는 것으로 추측되었다(그림 3-23).

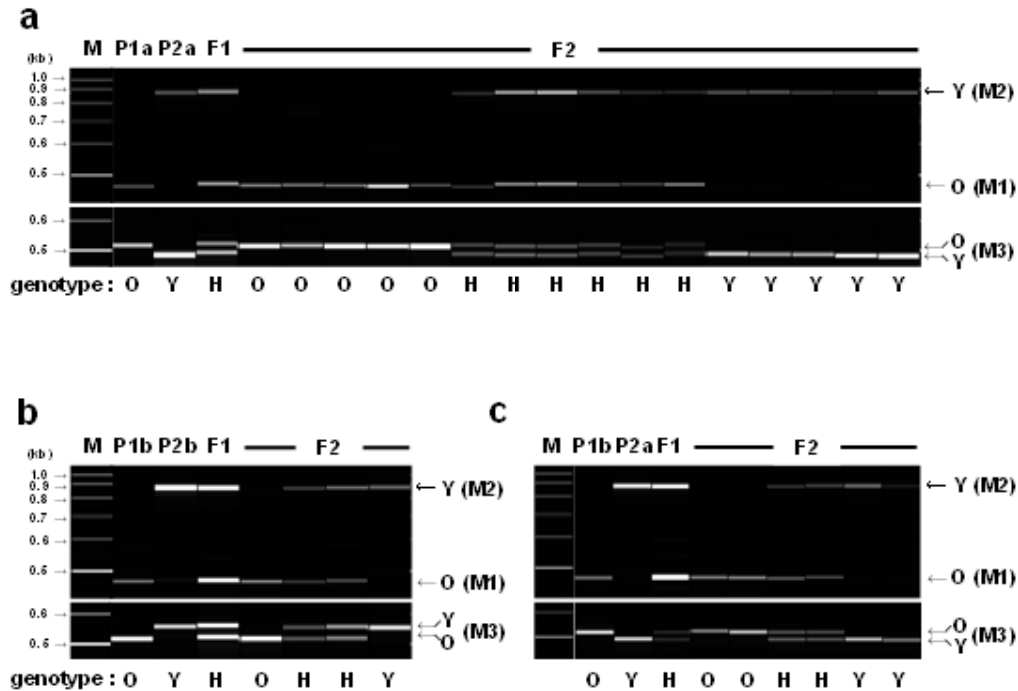


그림 3-22. Validation of molecular markers in F2 populations. Three F2 populations (a, b, and c) established from three cross combinations (S510-G6 x NS-G6, 32S-G7 x S955-G8, 32S-G7 x NS-G6, respectively) were analyzed using three markers (M1, M2, and M3). Amplified DNA fragments were separated and analyzed using Fragment analyzer, as described in the Materials and Methods. Y or O before the marker ID indicates specificity of the marker to *BrCRTISO1* of the YE or OC cultivar, respectively. M1 and M2 markers are dominant markers for YE and OC phenotypes, respectively, and they are on the same gel after independent PCRs because they show clear band size differences. M3 is a co-dominant marker showing both genotypes. ‘Genotype’ shown at the bottom indicates genotyping results of the OC and YE traits for each F2 plant judged by inspection of flower color in each F2 plant and their F2:3 progenies. Genotype is denoted as O, Y, and H for OC homozygote, YE homozygote, and their hybrid heterozygote genotype, respectively. Among 66 F2 plants, representative samples from 26 plants are shown. P1a and P1b indicate parental OC inbred lines, S510-G6 and 32S-G7, respectively; P2a and P2b indicate parental YE inbred lines, NS-G6 and S955-G8, respectively; P1b (32S-G7) and P2b (S955-G8) were used to identify *BrCRTISO1* genomic sequences and develop molecular markers. M indicates 100 bp DNA ladder.

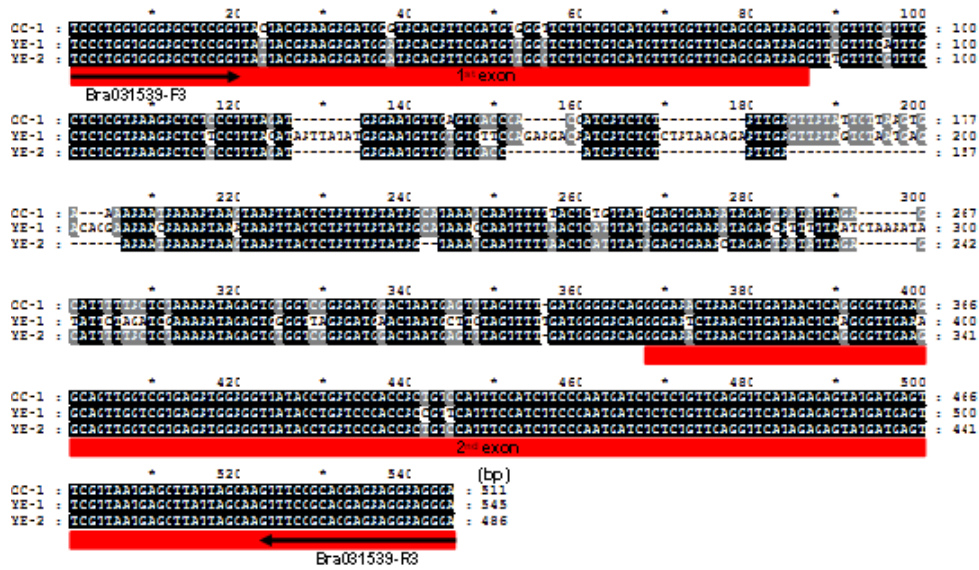


그림 3-23. Sequence validation of DNA fragments amplified by a co-dominant marker, Marker ID M3. Genomic DNA sequences amplified by the M3 marker were determined by direct sequencing with primers at both ends and compared with one another. OC-1, YE-1 and YE-1 indicate DNA sequences from OC inbred lines (P1a and P1b), YE inbred line (P2b), and YE inbred line (P2a), respectively, as analyzed in Fig. 5. Sizes (bp) of sequences are shown at the end of alignment. The two primers, Bra031539-F3 and Bra031539-R3, for the M3 marker are shown by black arrows. Red boxes indicate exons (1st and 2nd exons) predicted based on BRAD information. The alignment was generated using ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) and GeneDoc software.

타. 배추 기능성 품종육성을 위한 계통 육성 및 분자유종 연구

(1) 계통 선발 및 육성

내엽이 진노랑 계통들을 조합하여 이들을 성능 시험 후, 원예적 형질이 우수한 F1을 선발하고, 이들을 양친으로 활용하여 품종을 육성함과 동시에 이들과 원예적 형질이 보다 우수한 계통들과 조합하고 형질을 분리 고정시키기 위하여 2012년 1월 18일에 50조합을 하우스에 정식하여 성능검정을 실시하였다. 조합 예비선발에서 BN 70, 75, 76, 77, 78, 79가 대비종 BN 74와 비교하여 원예적 형질에서 뒤지지 않으면서 내엽색이 진노랑 형질을 가지고 있어 선발되었다(표 3-14)(그림 3-24).

표 3-14. 특성조사표

No.	계통명	회사명	외엽 색	내엽 색	엽장	엽 폭	구고	구 폭	구중	숙기	노균 병	뿌리 흑병
					cm	cm	cm	cm	g			
70	S955S510 x 325N1		녹	오렌지	33	24	22	14	900	중	중강	강
74	노랑쌈	사까다	농록	노랑	30	22	21	13	800	중조	강	약
75	913N1 x 1042NS2		농록	오렌지	32	23	20	13	800	중조	강	약
76	32553 x 955NS0		농록	오렌지	30	23	21	12	850	중조	강	약
77	325N2 x S955S510		농록	오렌지	32	24	22	13	850	중조	강	약
78	326NS0 x 325N1		농록	오렌지	32	24	22	14	750	중조	강	강
79	325NS0 x 913N1		농록	오렌지	33	23	21	13	800	중조	강	약
90	와와채	중국	녹	노랑	31	22	22	12	750	중	중	약
96	579MH52 x Wa2		농록	노랑	35	25	23	14	950	중	강	약
100	557MH52 x Wa2		농록	노랑	35	24	23	15	1000	중	강	강



그림 3-24. Selection of elite lines with orange colored inner leaves. Six lines, BN 70, 75, 76, 77, 78, and 79, were inbred by crossing between OC cultivar and conventionally cultivated Chinese cabbage and showed OC phenotype as well as good horticultural traits. BN 74, 90, 96 and 100 were YE cultivars.

이들 양친(S955S510, 325N1, 913N1, 1042NS2, 32553, 955NS0, 325N2, 325NS0, 913N1, 326NS0)을 선발한 후, 이들에 원예적 형질이 보다 우수한 계통들을 재조합하였다. 우선 선발된 양친들을 이용하여 성능 검정할 F1 조합을 만들고, 또한 원예적 형질이 보다 우수한 계통들을 재조합한 후 자식하여 F2를 만들기 위해, 파종하고 45일간 저온 처리 후 보광 및 가온이 되는 하우스에 정식을 하여 교배를 실시하였다(그림 3-25). 이후 성능 검정 및 모본선발을

위해 재조합한 F1들과 선발된 계통들에 원예적 형질이 보다 우수한 계통들을 재조합한 후 자식시킨 F2들의 종자를 파종하고 노지에 정식하였다(그림 3-26, 3-27)



그림 3-25. 저온처리 모본 교배 전경



그림 3-26. 성능검정 포장 전경



그림 3-27. F2 선발모본 전경

(2) 내엽색 연관 마커를 이용한 분자 육종

내엽색 연관 마커 3종을 이용해서 선발된 30개 고정 계통을 분석하였다(그림 3-28, 표 3-15). 그 결과, 15 계통은 오렌지 배추 내엽색 특이적 PCR product를 생성했고, 다른 15 계통은 일반 배추 내엽색 특이적 PCR product를 생성하였다. 이 분석 결과는 실제 내엽색과 완벽히 일치했으며, 잎 모양이나 결구 형태같은 다른 외형적 표현형과는 상관이 없었다. 따라서, 이 3종의 분자마커를 이용하면, 결구되기전 유묘시기에 내엽색을 미리 판별할 수 있을 것으로 예상되었다.

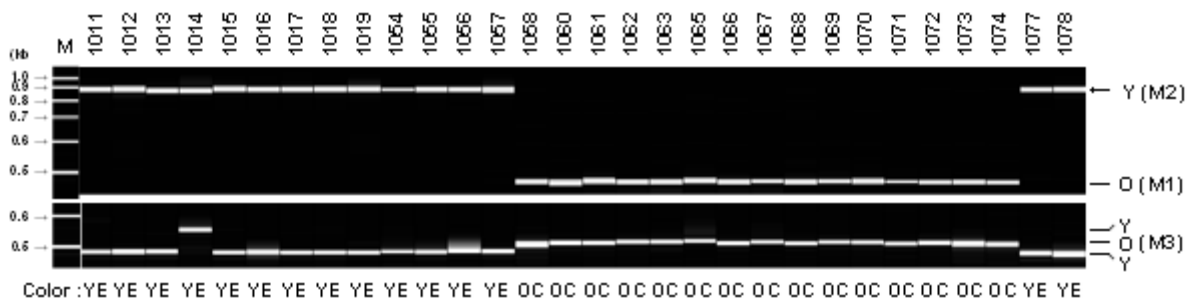













그림 3-28. Application of molecular markers to Chinese cabbage inbred lines. Thirty cultivars (no. 1011 to 1078 on the top) developed from crossing OC and YE inbred lines with other Korean *B. rapa* cultivars were analyzed using three markers (M1, M2, and M3). Amplified DNA fragments were separated and analyzed using Fragment analyzer, as described in the Materials and Methods. Y or O before the marker ID indicate specificity of the marker to *BrCRTIS01* of the YE or OC cultivar, respectively. M1 and M2 markers are dominant markers for YE and OC phenotypes, respectively, and they were run on the same gel after independent PCRs because they show clear band size differences. M3 is a co-dominant marker showing both genotypes. 'Color' shown at the







bottom indicates color of inner leaves observed at the heading stage. M indicates 100 bp DNA ladder.

표 3-15. 내엽색 연관 마커를 이용한 30개 고정계통 분석



고정계통번호	화색	외형 (2013-3-18, 배추와육종 비닐하우스)	Marker 검정결과			
			M1 (OC 특이)	M2 (YE 특이)	M3 (co-dominant)	유전자형
1011	Y		not detected (n.d.)	detected	Y	YE-homo
1012	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1013	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1014	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1015	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo

고정 계통 번호	화색	외형 (2013-3-18, 배추와육종 비닐하우스)	Marker 검정결과			
			M1 (OC 특이)	M2 (YE 특이)	M3 (co-dominant)	유전자형
1016	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1017	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1018	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1019	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1054	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1055	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo

고정 계통 번호	화색	외형 (2013-3-18, 배추와육종 비닐하우스)	Marker 검정결과			
			M1 (OC 특이)	M2 (YE 특이)	M3 (co-dominant)	유전자형
1056	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1057	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1058	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1060	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1061	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1062	O		detected	n.d.	O	OC-homo

고정 계통 번호	화색	외형 (2013-3-18, 배추와육종 비닐하우스)	Marker 검정결과			
			M1 (OC 특이)	M2 (YE 특이)	M3 (co-dominant)	유전자형
1063	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1065	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1066	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1067	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1068	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1069	O		detected	n.d.	O	OC-homo

고정 계통 번호	화색	외형 (2013-3-18, 배추와육종 비닐하우스)	Marker 검정결과			
			M1 (OC 특이)	M2 (YE 특이)	M3 (co-dominant)	유전자형
1070	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1071	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1072	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1073	O		detected	n.d.	O	OC-homo
1074	O		detected	n.d.	O	OC-homo

고정 계통 번호	화색	외형 (2013-3-18, 배추와육종 비닐하우스)	Marker 검정결과			
			M1 (OC 특이)	M2 (YE 특이)	M3 (co-dominant)	유전자형
1077	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo
1078	Y		n.d.	detected	Y	YE-homo

4. 콩 종실 phytate함량 관련 마커 개발 및 적용

가. 유전 자원 수집

본 연구실에서는 1200여점의 콩 유전자원이 이미 확보해 놓고 있었고, 콩 종실의 phytate 함량 관련 마커 개발을 위해 동국대학교의 2001년 “피틴산, 레시틴 고함유성 콩품종선발과 레시틴 이용기술개선에 관한 연구” 보고서에서 피틴산 함량이 조사된 대립종 2점, 검은콩 3점, 도입종 2점, 나물콩 5점, 장려품종 4점을 해당 실험실에서 분양받았다. 또한 현재까지 보고된 저피틴산 대두 돌연변이 4종 중에서 중국에서 육성된 농업적 형질들의 저하가 나타나지 않은 *Gm-lpa-ZC-2* 돌연변이를 Qing-Yao Shu로부터 분양받아 유전자원을 수집하였다.

나. 콩 종실 피틴산 함량의 정밀 정량 방법 확립

(1) UV Spectrophotometer를 이용한 방법

- (가) 각각의 콩 유전자원 샘플의 종실을 분쇄기에 갈아 0.5mm체에 곱게 거른다.
- (나) 거른 샘플 중 0.5g을 2.4% HCl에 완전히 혼합시킨 후 Shaking Incubator에서 16시간 동안 배양시켜 샘플 내 피틴산을 추출시킨다.
- (다) 배양이 끝나면 10℃에서 20분간 원심 분리시킨 후 색도계 반응에 영향을 끼칠 수 있는 요소들을 침전시키기 위해 피틴산이 추출된 상등액에 NaCl 1g을 첨가한다.
- (라) NaCl이 첨가된 상등액 중 1mL를 증류수에 25배 희석시키고 그 중 3mL에 Wade's Reagent(0.03% FeCl₃·6H₂O + 0.3% sulfosalicylic acid)를 첨가한다.
- (마) 정량을 위한 표준 용액을 위해 Sodium Phytate를 이용, 0, 1.12, 2.24, 3.36, 5.6, 7.84, 8.96 and 11.2 ppm의 표준용액을 준비한다.

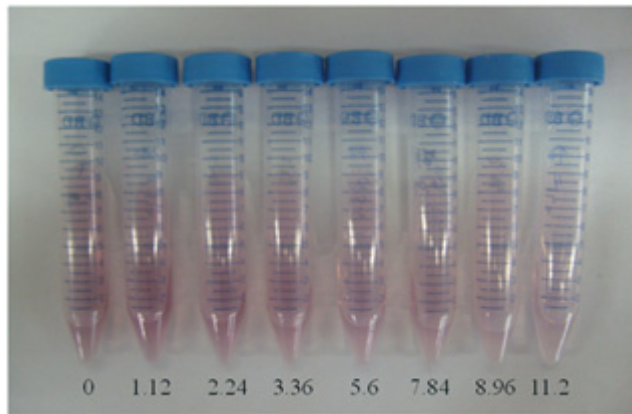


그림 4-1. 피틴산 정량을 위해 제작된 표준용액: 피틴산의 농도가 높을수록 색이 옅음.

(바) 준비된 표준용액과 추출된 피틴산 용액을 UV Spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정, 피틴산을 정량한다.

표 4-1. 측정된 표준용액의 흡광도: 정확도를 위해 흡광도 측정을 서로 다른 흡광계를 이용하여 3반복 실행.

Standards	Nanodrop			Spectrophotometer		
	First	Second	Third	First	Second	Third
0	0.050	0.049	0.040	0.226	0.089	0.097
1.12	0.046	0.039	0.034	-0.029	0.287	0.297
2.24	0.041	0.037	0.033	0.193	0.310	0.317
3.36	0.038	0.036	0.033	0.332	0.325	0.333
5.60	0.032	0.031	0.028	-0.148	0.169	0.176
7.84	0.026	0.028	0.023	0.164	-0.114	-0.105
8.96	0.026	0.025	0.019	-0.215	-0.136	-0.128
11.20	0.020	0.019	0.015	0.050	-0.194	-0.193

표 4-2. 샘플 32개에 대해 측정된 평균 흡광도.

Samples	Nanodrop	Spectrophotometer
S1	0.025	-0.177
S2	0.026	-0.169
S3	0.026	-0.163
S4	0.026	-0.159
S5	0.027	-0.157
S6	0.028	-0.156
S7	0.028	-0.155
S8	0.028	-0.150
S9	0.028	-0.146
S10	0.029	-0.145
S11	0.029	-0.130
S12	0.029	-0.128
S13	0.029	-0.119
S14	0.029	-0.092
S15	0.029	0.077
S16	0.029	0.100
S17	0.030	0.144
S18	0.030	0.184
S19	0.030	0.225
S20	0.031	0.225
S21	0.031	0.229
S22	0.031	0.231
S23	0.031	0.232
S24	0.033	0.301
S25	0.033	0.339
S26	0.033	0.358
S27	0.034	0.572
S28	0.034	0.588
S29	0.035	0.697
S30	0.035	0.713
S31	0.037	0.746
S32	0.038	0.756

(2) Colormetric 방법

- (가) 각각의 콩 유전자원 샘플의 종질을 크기에 따라 1/2 또는 1/3가량 배를 제외하고 자른다.
- (나) 자른 샘플을 각각 96-well plate에 넣고 12.5% TCA:25mM MgCl₂용액을 첨가하여 15 시간동안 두어 샘플내 피틴산을 추출시킨다.
- (다) 추출된 피틴산 중 각각 10ul를 새로운 96-well plate에 분배하고 90ul의 증류수와 Chen's Reagent(10% Ascorbic:12.5% Ammonium molybdate tetrahydrate:6M H₂SO₄:ddH₂O=1:1:1:2)를 첨가한다.
- (라) 정량을 위한 표준 용액을 위해 1mM K₂HPO₄ · 3H₂O를 이용, 0, 5, 15, 30, 45ul의 표준용액을 준비한다.
- (마) Chen's Reagent를 처리한 추출된 피틴산을 30여분 두면 그 함량에 따라 색의 농도가 변한다.

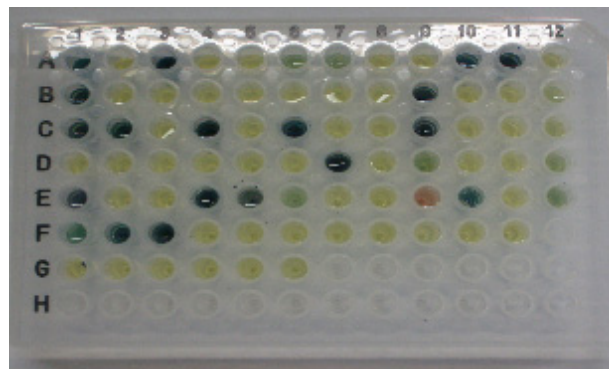


그림 4-2. 샘플 72개에 대해 측정된 농도. 농도가 가장 짙은 것이 저함량의 피틴산.

다. 피틴산 함량 분류분석에 따른 저피틴산 돌연변이 선발

1, 2차년도를 통해 분양받아 보유한 콩 유전자원 720여점에 대해 Colorimetric 방법으로 피틴산 함량 분류분석을 실시하였다. 그 결과 보유한 유전자원 중에서는 돌연변이를 선발하지 못하였으나 중국에서 분양받은 *Gm-lpa-ZC-2* 돌연변이에 동일한 정량방법을 적용한 결과, 확립한 정량방법의 유용함이 확인되었다.

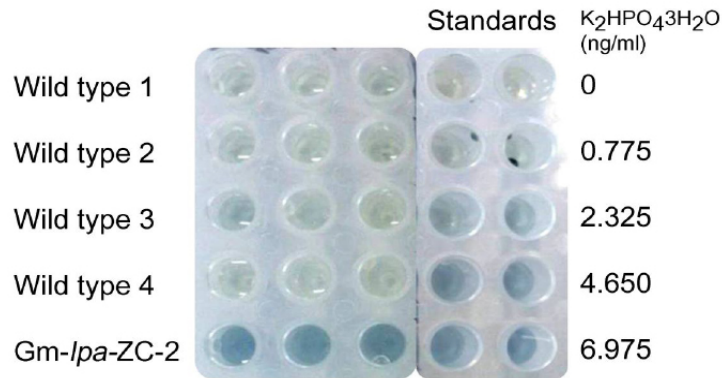


그림 4-3. 야생형과 돌연변이에 대한 피틴산 분석. 농도가 가장 짙은 것이 저함량의 피틴산.

라. 피틴산 함량관련 DNA 마커 개발을 위한 유전집단 양성

본 연구실에서 보유하고 있는 약 720여점의 대두 유전자원에 대해 저피틴산 스크리닝 실험을 진행하였으나, 자연발생 저피틴산 돌연변이가 탐색되지 않아 기보고된 저피틴산 돌연변이들 중, 피틴산 함량 관련 유전자가 확인되지 않은 *Gm-lpa-ZC-2* 돌연변이를 중국의 Qingyao Shu 그룹으로부터 분양받아 연구를 진행하였다. 하지만 현재까지 보고된 저피틴산 돌연변이들은 발아율이 낮다고 알려져 있고 분양받은 *Gm-lpa-ZC-2* 돌연변이도 극히 낮은 발아율을 보여 육종 및 유전자지도 작성을 위한 집단양성에 어려움이 있었다.

확보한 저피틴산 대두 돌연변이의 충분한 종자확보를 위해 대량증식을 실시하였다. 그 후, 국내 다수성 장려품종인 진품콩 2호와 교배하여 F1 종자 30립을 확보하였고 확보한 F1 종자 30립을 하우스 파종 후 장일처리하여 포장에 이식하였다.

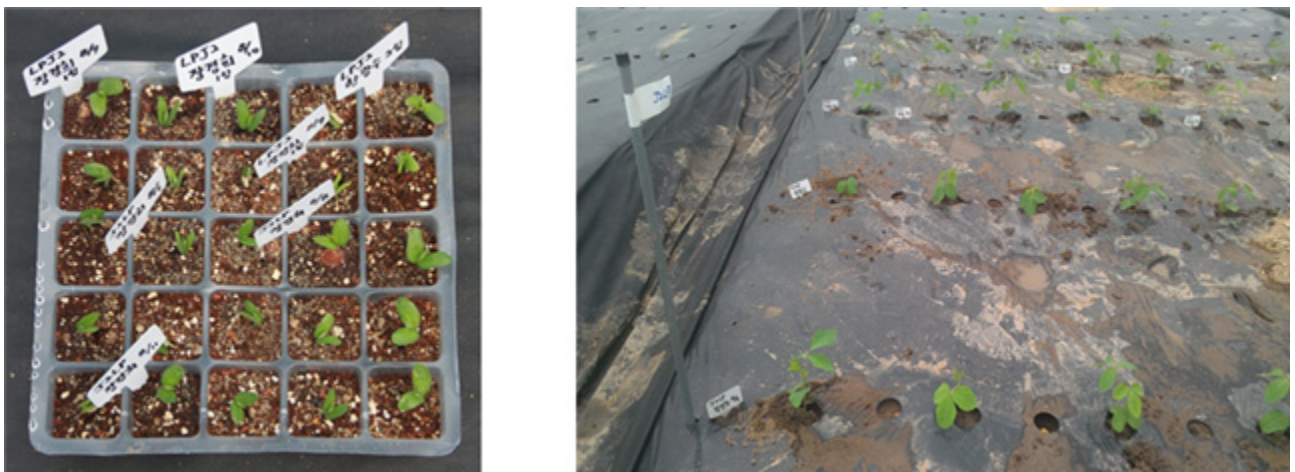


그림 4-4. 하우스에 육묘한 F1 종자들과 포장 이식 후의 모습

대두는 자식성 작물로서 교배시에 Selfing이 될 확률이 높아 *Gm-lpa-ZC-2* 돌연변이(흰색)와 국내 다수성 장러품종인 진품콩 2호(자색)의 배축색(자색이 우성)의 차이를 통해 교배여부를 판단하였다.

표 4-3. 교배모부본 및 F1 hybrid의 배축색, 화색의 조사를 통한 교배여부 확인

7	넘버	1	2	3	4	5	6	7			
	교배명	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP			
	교배자	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희			
	교배일시	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10			
	배축색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색			
	화색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	흰색?		
	교배여부	△	△	△	△	△	△	△			
6	넘버	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	교배명	LPJ2	LPJ2	LPJ2	LPJ2	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP
	교배자	한광수	한광수	한광수	한광수	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희
	교배일시	미상	미상	미상	미상	8/1	8/1	8/8	8/8	8/8	8/8
	배축색	녹색	녹색	녹색	녹색	자색	자색	자색	자색	자색	자색
	화색	흰색	흰색	흰색	흰색	자색	자색	자색	자색	자색	자색
	교배여부	X	X	X	X	△	△	△	△	△	△
5	넘버	1	2	3	4	5	6	7			
	교배명	LPJ2	LPJ2	LPJ2	LPJ2	LPJ2	LPJ2	LPJ2			
	교배자	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희			
	교배일시	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/10	8/10			
	배축색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색			
	화색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색			
	교배여부	O	O	O	O	O	O	O			
4	넘버	1	2	3	4	5	6	7	8		
	교배명	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP		
	교배자	한광수	한광수	한광수	한광수	한광수	한광수	한광수	한광수		
	교배일시	미상	미상	미상	미상	미상	미상	미상	미상		
	배축색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색		
	화색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색		
	교배여부	△	△	△	△	△	△	△			
3	넘버	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	교배명	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP	J2LP
	교배자	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희	장경희
	교배일시	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9
	배축색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색
	화색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색	자색
	교배여부	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△
2	Jinpumkong2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>Gm-lpa-ZC-2</i>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

교배여부가 확인된 F1 plant로부터 F2 종자들을 개체수확하였고, 향후 몇 년간 세대진전을 통하여 RIL 집단을 양성할 계획이다. 이렇게 양성된 RIL 집단은 본 연구실의 저피틴산 품종 개발과 유전자지도 작성을 위한 재료로 이용될 것이다.



그림 4-5. 하절기 실시한 대량 교배

마. 피틴산 함량관련 후보 유전자군 선정 및 변이 확인

그동안 작물에서 피틴산의 함량에 관여하는 주요 유전자군으로 *MIPS*(*myo*-inositol phosphate synthase)가 알려져 있었고 대두에서는 *MIPS1* 유전자가 피틴산의 함량에 관여하는 것으로 밝혀져 있었다. 그러나 최근 CX1834 저피틴산 대두 돌연변이의 경우, *MRP ABC*(Multidrug resistance - associated protein ATP-binding cassette transporter) 유전자군인 Glyma03g32500 과 Glyma19g35230, 두 유전자가 피틴산의 함량에 관여한 것으로 밝혀졌다.

2차년도에 확보한 *Gm-lpa-ZC-2* 돌연변이의 경우, 염색체 14번에서 mapping만 되었을 뿐 관련 유전자는 밝혀지지 않았고 *MIPS1*, Glyma03g32500, Glyma19g35230은 염색체 14번에 존재하는 유전자들이 아니기 때문에 *Gm-lpa-ZC-2*의 변이 후보 유전자에 접근하기 위하여 대두의 전체 염기 서열 정보를 제공하고 있는 Phytozome에서 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 수행하였다. BLAST 결과, 염색체 14번에서 *MRP ABC* 유전자군인 Glyma14g01900 이 탐색되어 최종적으로 Glyma14g01900, *MIPS1*, Glyma03g32500, Glyma19g35230을 *Gm-lpa-ZC-2*에 대한 후보 유전자들로 선정하였다. 후보 유전자들의 전 영역을 커버하는 총 40쌍의 Primer를 제작하여 Sequencing하였고 총 14개의 단일염기 다형성을 발견하였다.

그 중, Glyma14g01900 유전자의 1번 Exon에서 구아닌이 시토신으로 치환되어 아미노산 분석 결과, 류신 아미노산이 페닐알라닌 아미노산으로 변환되는 Missense mutation을 확인하였고, *MIPS1* 유전자의 6번 Exon에서 티민이 삭제되어 Frameshift에 의한 Early termination이 예측되었는데, 이는 또 다른 저피틴산 대두 돌연변이인 *Gm-lpa-TW-1* 돌연변이에서 염기 두 개가 결실된 것(*MIPS1* 유전자 3번 Exon의 아데닌과 구아닌 결실)과 흡사한 것으로 동일한 기능저하가 예상된다.

표 4-4. 탐색된 총 14개의 단일염기 다형성에 대한 분석결과

Gene name	Position	SNP	Codon	Amino acid	Mutation
Glyma14g01900	Exon 1	G/C	TTG/TTC	L/F	Missense
	Intron 7	T/A			
Glyma03g32500 (Lpa1)	Intron 5	T/-			
	Intron 6	A/G			
	Exon 13	C/A	CTG/ATG	L/M	Missense
Glyma19g35230 (Lpa1)					
Glyma18g02210 (MIPS1)	Intron 3	A/G			
	Exon 4	C/T	TAC/TAT	Y/Y	Silent
	Exon 4	T/C	ATT/ATC	I/I	Silent
	Exon 5	C/T	GCC/GCT	A/A	Silent
	Exon 5	C/T	AGC/AGT	S/S	Silent
	Intron 5	G/T			
	Exon 6	T/-	CTT/CTG	L/-	Nonsense
	Exon 7	A/-	ATC/-	I/-	
Exon 7	C/A	CCC/-	P/-		

바. SNAP 마커 개발

위에서 확인된 Glyma14g01900 유전자의 단일염기 다형성에 대해 WebSNAPER 프로그램을 이용하여 SNAP(Single Nucleotide Amplified Polymorphism) 마커를 개발하였다.

표 4-5. Glyma14g01900 유전자의 변이를 이용하여 개발된 2종의 SNAP 마커

Allele	Primer sequence	Expected size
G specific (Wild type)	F: TGGTCAGAAGAAAAGCTTGTGACCCCTTATG	359 bp
	R: TCCTTTGACTCCAAGGCATCGCTATTC	
C specific (Mutant)	F: GGTCAGAAGAAAAGCTTGTGACCCCTTCC	358 bp
	R: TCCTTTGACTCCAAGGCATCGCTATTC	

개발된 2종의 SNAP 마커를 15종의 야생형과 돌연변이에 적용한 결과 G-specific 마커는 야생형만을 선택적으로 증폭시켰고, C-specific 마커는 돌연변이만을 선택적으로 증폭시킴을 확인하였다.

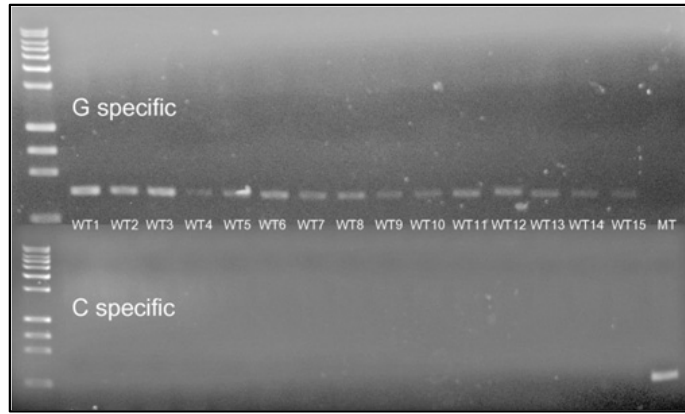


그림 4-6. 개발된 2종의 SNAP 마커를 이용하여 야생형들과 돌연변이에 실시한 Genotyping.

추가로 1bp deletion(-/G) 변이가 확인된 Glyma18g02210(myo-inositol phosphate synthase) 유전자에 Primer를 디자인하여 Wild type을 나타내는 T allele과 돌연변이를 나타내는 G allele을 구분하는 SNAP(Single Nucleotide Amplified Polymorphism) 마커를 개발하였다.

표 4-6. Glyma18g02210 유전자의 변이를 이용하여 개발된 SNAP 마커

Allele	Primer sequence	Expected size
T specific (Wild type)	F: TGTTGTTGTCATCAGGGCTGATTGAACTT R: GATTCATACCATCATTGTTTCCCAGATGGTT	343 bp
G specific (Mutant)	F: GTTGTCATCAGGGCTGATTGATCCG R: GATTCATACCATCATTGTTTCCCAGATGGTT	339 bp

개발된 SNAP 마커를 Wild type인 Williams 82와 *Gm-lpa-ZC-2* 돌연변이에 적용한 결과, T-specific 마커는 Wild type만을 선택적으로 증폭시켰고, G-specific 마커는 돌연변이만을 선택적으로 증폭시킴을 확인하였다.

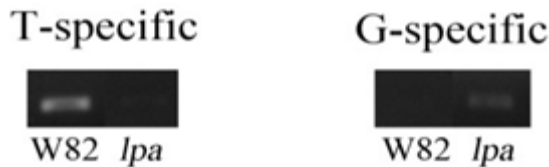


그림 4-7. 개발된 SNAP마커를 이용하여 Wild type과 돌연변이에 실시한 PCR 결과

Whole genome sequencing을 비롯한 대두의 다양한 연구데이터를 제공하고 있는 Soybase에 대두의 RNA-seq데이터가 업로드되면서 대두의 유전체에 존재하는 유전자들의 전사여부 및 양상을 쉽게 알 수 있게 되었다. 이 RNA-seq데이터를 통해 후보 유전자 중, *lpa* homolog가 전사되지 않는 pseudo gene이라는 것이 확인되었다. 따라서 이 유전자에 대한 마커 개발은 불필요한 것으로 판단된다.

5절 omics 기술을 활용한 배추 환경내성 마커 개발 및 유전자 동정 (제2-2 세부과제)

1. 건조 stress 대응 단백질체 발현현상 탐색

가. 지부배추 건조처리

- ① 공시재료: 지부배추
- ② 종자는 petri-dish에 침종하여 24시간 25℃에서 발아시켜 종자 하나당 하나의 pot에 이식했다.
- ③ 종자가 심겨진 화분을 Growth Chamber 내에서 25℃, 70%(Relative Humidity), 16hr day/8hr night 의 조건으로 3주간 매일 수분을 공하며 재배함.
- ④ 실험군에 사용될 배추는 흙을 포함하여 뿌리채로 pot에서 제거하여 Growth Chamber 내의 대기과 빛에 노출하고 수분공급을 중단하여 건조 stress를 처리한다.
- ⑤ 건조처리 직전 3주된 시료를 수확하여 대조구로 활용하고. 건조처리 24hr, 48hr후 각각 시료를 수확 하였다.



그림 1. 지부배추 유묘의 건조 stress 반응(Control, 24hr After Drought, 48hr After Drought)

대조구의 유묘들은 잎이 정상의 모습이었으나, 24시간 건조처리 후 잎이 마르기 시작하였으며 한 두 잎에서 잎이 말리는 모습을 보였다. 48시간 후에는 모든 잎이 말려있으며 외형상 잎이 상당히 건조된 모습을 보이고 있다.

본 실험에서 처리한 건조 stress에 대한 반응이 각 처리구에서 명확히 차이가 났으며 이 시료의 잎을 사용하여 단백질체 분석을 하였다.

나. 배추 잎 단백질 추출 및 1D-LDS PAGE 분석

① 배추 잎 단백질 추출

질소를 이용하여 막대사발로 배추잎을 곱게 갈아주어 세포벽을 파괴시킨 후, Urea buffer(8M Urea/5mM DTT/1% LDS/100mM Tris pH8.5)를 이용하여 단백질을 추출함.

② 2-D Quant Kit 을 이용한 배추 잎 단백질 정량

2-D Quant Kit(GE Healthcare)을 이용하여 단백질 발색반응을 기준으로 정량하였는데 Bovine serum albumin (BSA) standard solution의 발색반응을 회귀식으로 작성하여 정량하였다. 그림 2는 standard solution의 회귀식이다.

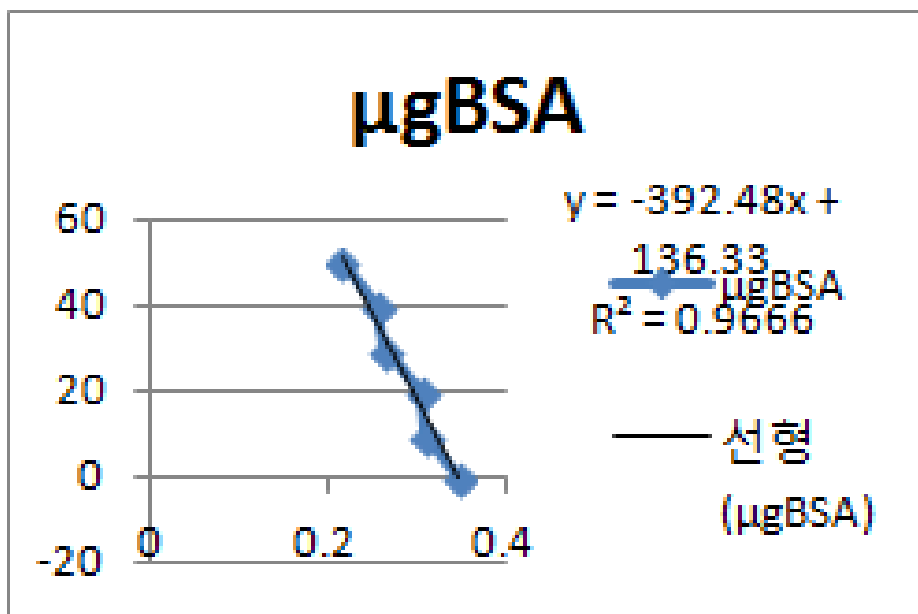


그림 2. 단백질 정량에 활용한 회귀식

③ 단백질 전기영동 ; 1D-LDS-PAGE

- 추출된 배추 단백질을 50µg 씩 실험에 이용할 수 있도록 정량된 값을 이용하여 전기영동에 이용하였다.
- NuPAGE[®] Bis-Tris Mini Gels(novex by life technologies) (4~12%) 에 Sample(Sample/NuPAGE[®] LDS Sample Buffer(4X)/NuPAGE[®] Reducing Agent(10X)/Deionized Water) 을 Loading 하였다.
- 110mA에서 약 40~50 분간 전기영동을 하였다.
- 전기영동이 완료된 gel 은 Fixing Solution(Deionized Water 40ml/Methanol 50ml/Acetic Acid 10ml) 100ml에 10분간 fixing 하였다.
- Fixing Solution 을 잘 따라낸 후, Staining Solution(Deionized Water 55ml/Methanol 20ml/Stainer A 20ml,NOVEX[®] Colloidal Blue Stain Kit/Stainer B 5ml,NOVEX[®] Colloidal Blue Stain Kit) 에 넣어 gel을 staining 하였다.
- Staining 시에는 먼저 stainer A를 넣고 10분간 shake 한 후 stainer B 를 넣고 12시간

정도 staining 하였다.

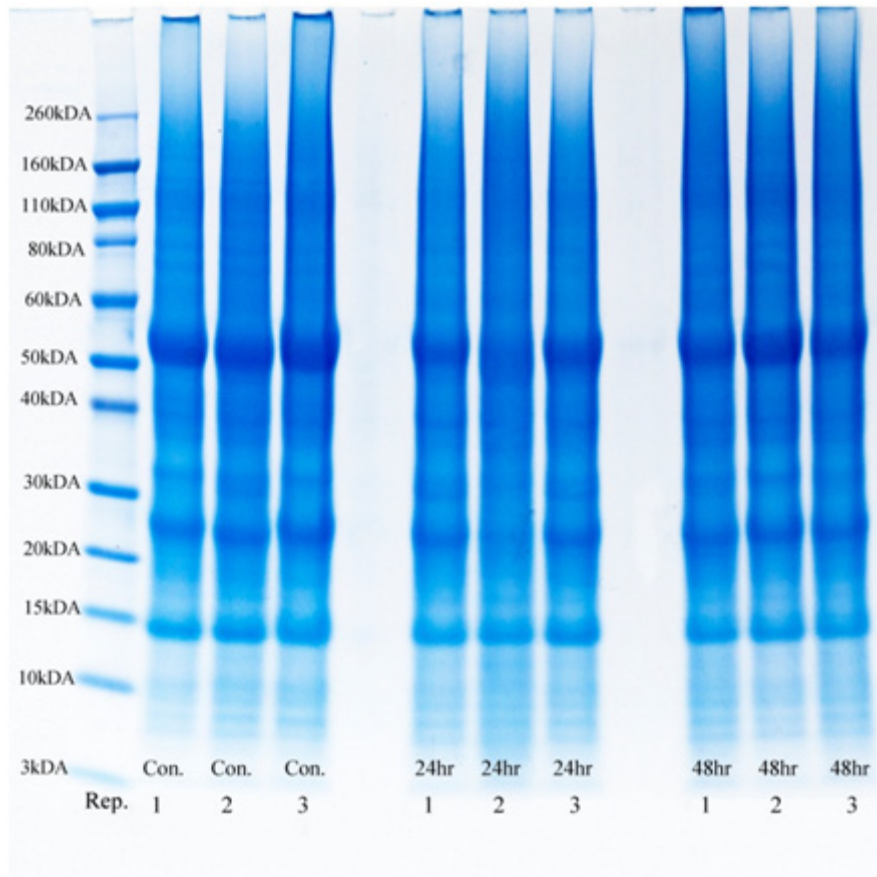


그림 3. 배추 단백질체 1D-LDS-PAGE

- 1D-LDS-PAGE 로 분리전개한 결과 전체 단백질이 (high molecular weigh~ low molecular weight protein) gel상에 넓게 분리되었다.
- 대조구와 24hrs, 48hrs에서 1D-LDS-PAGE 분석 결과, gel 상에서는 차이를 구분할 수가 없었다.

다. Shotgun Proteomics 분석을 배추 잎의 건조 stress에 대응하는 단백질 탐색

- ① 1D-LDS PAGE로 분리된 단백질의 동정을 위해 각 레인 (시료) 별로 7등분하여 In-gel-digestion 했다.
- 7 조각으로 잘린 각각의 조각을 약 1mm 정도의 정육면체로 잘게 썰어 1.5ml tube에 구분하여 담았다.(그림 4)

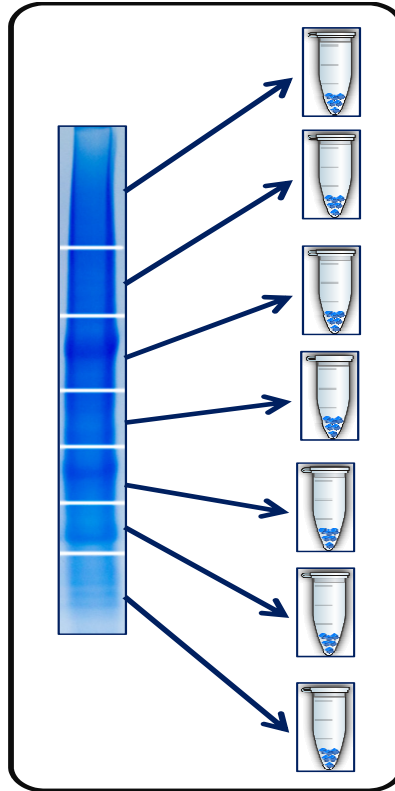


그림 4. shotgun proteomics 분석을 위한 gel slicing 방법.

- 각각의 tube에 destaining buffer(50% acetonitril(ACN) in 50mM ammonium bicarbonate(ABC) pH 7.8) 를 처리하여 Coomassie blue 염색을 제거하고, 각 gel에 포함된 단백질을 reduction (10mM DTT in 25mM ABC), alkylation (55mM iodoacetamide) 과정을 거친 후 trypsin digestion (trypsin 12.5ng/μl in 50mM ABC)을 한다. digestion 된 peptide 를 회수하여 질량분석기로 분석한다.

② LC MS/MS Analysis with Q Exactive

- Nanoflow HPLC instrument 는 Q Exactive mass spectrometer와 on-line 으로 연결하여 분석하였다. 분석에 쓰이는 column 들은 Alltima C18-AQ 5um resin 으로 쌓여있다.
- peptide 분리를 위한 LC 조건은 다음과 같다.
0.1% Formic acid (buffer A), acetonitrile in 0.1% Formic acid (buffer B)
linear gradient of 3-60% buffer B at a flow rate of 250nL/min.
run time for an LC MS/MS is 110min.
- MS/MS spectra 수집 조건은 다음과 같다.
data-dependent top8 method dynamically choosing the most abundant precursor ions
Dynamic exclusion duration was 60
HCD fragmentation
Survey scans were acquired at a resolution of 70,000 at m/z 200
Resolution for HCD spectra was set to 17,500 at m/z

③ Analysis of Proteomic Data

- 단백질의 동정은 Q-Extractive 분석으로 얻어진 MS/MS spectra로 자료는 Proteome Discoverer(version 1. 3) software를 이용하여 분석했다. 배추 genome database 는 Brassica nappa V1.2의 단백질 database를 사용하였고. 그림 5는 사용한 지부배추 genome 단백질 database의 일부분이다.

```
>Bra000001 | DNase I-like superfamily protein
MGKILKTKSSWPRTVVRKWLNLNRSSAYEFHSDYQVKGERLARAVTEPTQPRRKSCSDGDYYMIVP
>Bra000002 | nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
MEEVRKMGCMKVRPFILWLLQVGLAGMDVLSKAVLNKGMNSYVLWYRHAVATLVMAPFALY
>Bra000003 | unknown protein;
MSSVCGKLDKDFDADFIDISTSSPPTQCCNGSKHSSHAGSEESQESDGDDETGYIHQTENEDSVTKDL
>Bra000004 | unknown protein;
MIRRLFSSLTHRFGWRIPFLYLGATWTAFLTITVAIISLAPEFAFVSAIYSSSSVSSRRRCGSDAAVLM
>Bra000005 | ARF-GAP domain 7
MAAARRLRTLQSQAENKVCVDCSQKNPQWASVSYGIFMCLECSGKHRGLGVHISFVRSVTMDSI
>Bra000006 | Histone superfamily protein
MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGSKPAIRRLDRRGVGRISGLIYEETRGVLKIFLENVMI
>Bra000007 | RING/U-box superfamily protein
MFNDTTTFGSGAEAVWPTSTTIPTTFPGTITSNSTFIIIIGPPPPFPAPPRSINFTPLILIFAWVAIIAVF
>Bra000008 | DNA binding with one finger 2.4
MVFSSIQAYLDSSNWQQAPPSNHNQGGAGASDTGGHGLFTQPQSN GSGGSGSIRPGSMVDR/
>Bra000009 | Ribosomal protein L36e family protein
MSEITRLMQEEVTLGEVSDMREGFSDDKLVLDISRKRKRSEEKEEVQKDKDVKFPTPENRISEVRI
>Bra000010 | actin 3
MADGEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPISVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDDEAQ
```

그림 5. 지부배추 Database

④ 배추 잎 단백질체 database 구축.

- 지금까지 본 연구진의 연구와 같은 대용량 배추 잎 단백질체 분석에 대한 보고가 없었

는데, 본 실험에서 사용된 모든 처리 및 반복에서 동정된 단백질을 모두 합쳐서 3009 개의 non-redundant 배추 잎 단백질체 database 를 구축하였다. 표 1은 배추 3009개의 단백질 중에서 위에서 가장 많이 존재하는 10개의 단백질을 나타냈다. 10개 모두 광합성과 관련이 있는 단백질이었다.

표 1. 가장 많이 존재하는 10개의 배추 잎 단백질체

Accession	Description	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	SpC/L	NSpC
Bra028181	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	342	162	18.4	8.05	2.111111	0.021362062
Bra028087	ribulose-biphosphate carboxylases	859	479	52.9	6.29	1.793319	0.018146369
Bra028406	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	242	181	20.2	8.05	1.337017	0.013529099
Bra034028	ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A	118	158	17.9	6.76	0.746835	0.007557132
Bra025431	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	122	181	20.2	8.05	0.674033	0.006820455
Bra022976	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	168	266	28.2	5.15	0.631579	0.006390866
Bra010807	chlorophyll A/B-binding protein 2	167	267	28.1	5.12	0.625468	0.006329032
Bra005425	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	163	266	28.1	5.43	0.612782	0.006200662
Bra000144	rubisco activase	279	475	51.9	5.96	0.587368	0.005943506
Bra030182	chlorophyll A/B binding protein 1	148	267	28.2	5.66	0.554307	0.005608963

- 동정된 3009 단백질의 물리화학적 특성의 분포를 조사하였다. 그림 6에서 보면 pI value 가 5~7 사이의 단백질이 가장 많이 동정되었고, 8 이상의 단백질도 50% 이상 동정되었는데, 이는 기존의 2D-PAGE 연구 기술에서 동정하기 힘든 단백질로, 본 연구진의 shotgun proteomics 분석에서는 동정되는 단백질들의 pI value에 편이가 없음을 나타낸다.

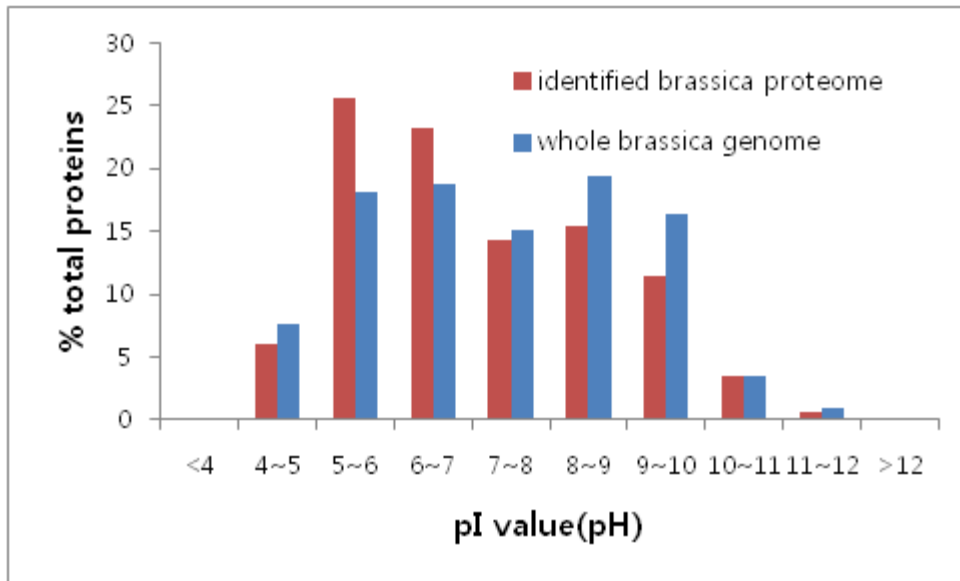


그림 6. 동정된 배추 잎 단백질체의 pI value 분포도

- 그림 7은 동정된 단백질체의 분자량 분포도를 나타낸 것이다. 10KDa 이하에서 120KDa 이상의 폭넓은 분자량의 단백질들이 동정되었다. 대부분의 단백질들은 20~ 70KDa 에 대부분의 단백질이 분포하고 있다.

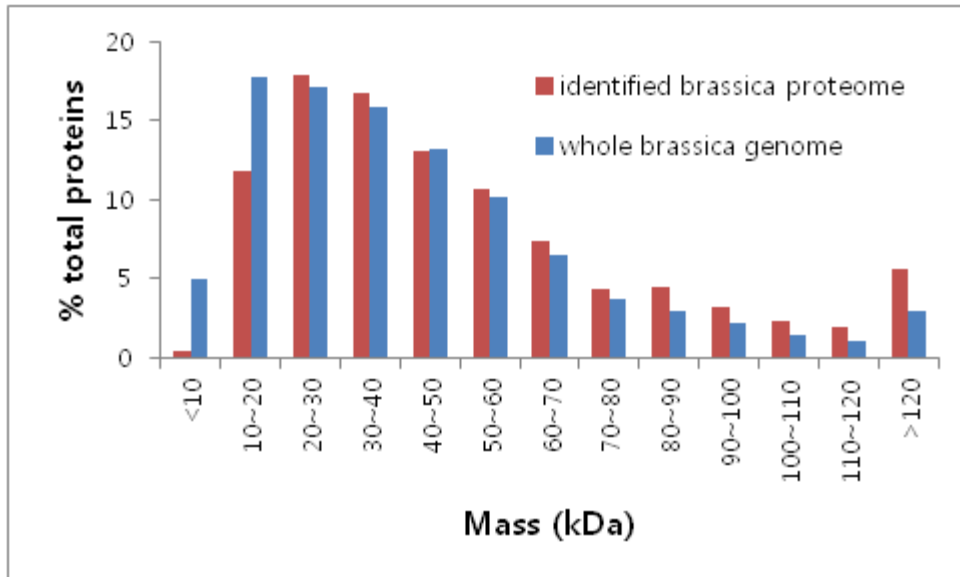


그림 7. 동정된 배추 잎 단백질체의 분자량 분포도.

⑤ 배추 잎 단백질체 분류

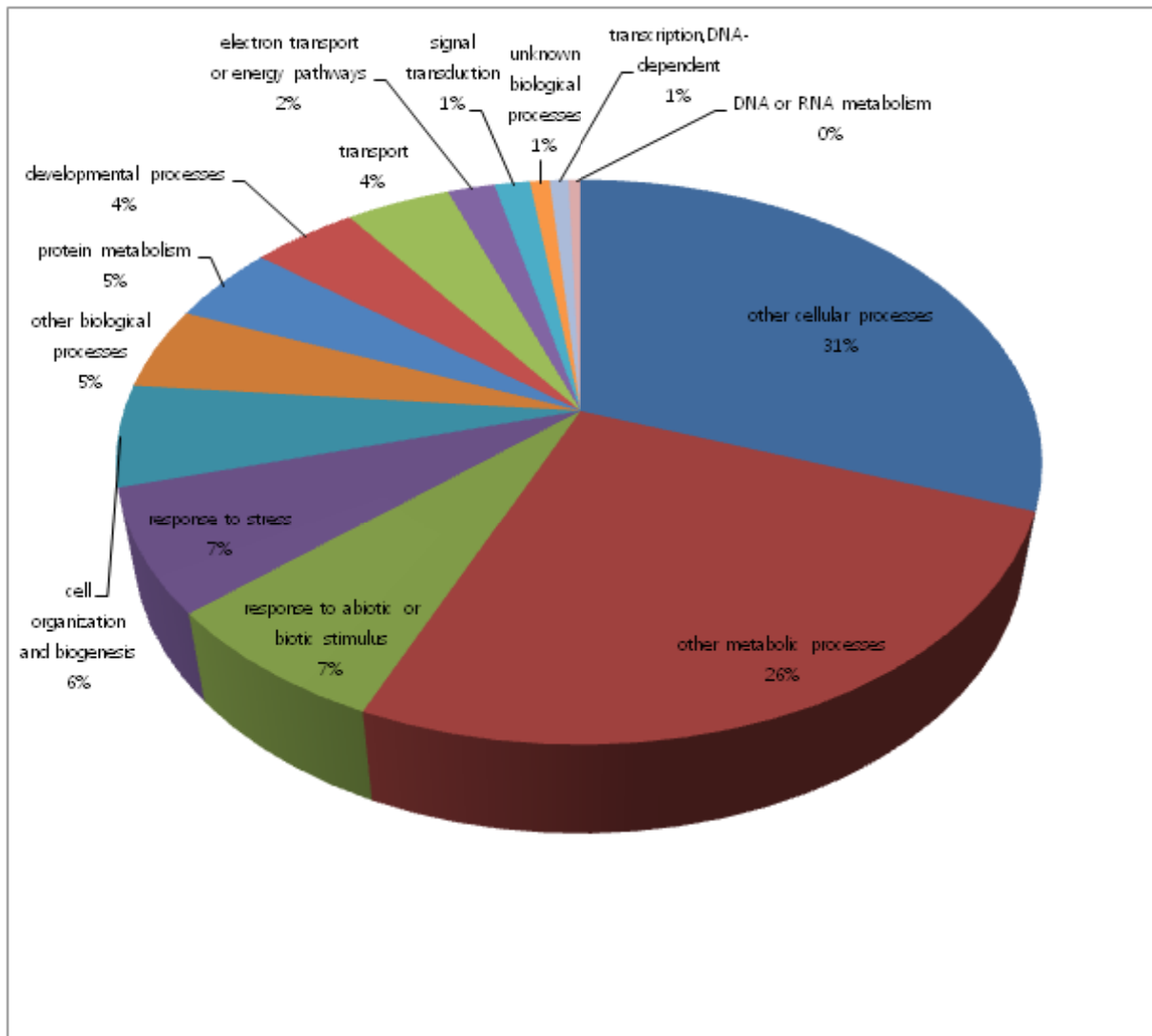


그림 8. Biological Process classification

- 전체 배추 데이터베이스의 단백질들과 동정된 3009개의 단백질을 각각 classification 하여 그래프로 나타내었다. 다른 biological process 단백질들의 비율은 크게 변하지 않았으나 외부 자극에 반응하는 단백질은 14% 정도로 전체 배추 단백질에서의 비율에서 보다 소폭 증가하였다. 이것으로 미루어 보아 배추가 외부 자극에 대응하여 관련 단백질의 발현량이 증가된 것으로 생각된다.

⑥ 건조 stress에 대한 특이발현 단백질 동정

- 동정된 단백질들에 대하여 상대적인 발현량을 spectral count 방법으로 정량하였다.
- control 과 건조처리 24hrs, 48hrs 에서의 상대적인 발현량에 대하여 분산분석을 실행하여 440개의 특이발현 단백질이 동정되었다. 이 후보 단백질들 중 기존에 밝혀진 Arabidopsis 단백질에 BLAST비교하고, Annotation 결과와 비교하여 환경 stress에 관여하는 저항성 관여 단백질을 선발 중이고 다음 표 2는 그 중 발현량의 차이가 큰 대표적인 단백질 10개를 제시하였다. Bra016644 (heat shock protein 70b) 의 경우 건조처리 48hrs 에서 크게 발현량이 증가하였는데, 이는 본 연구에서 건조처리 stress 가 적당하게 처리되었음을 의미한다. 그리고 H(+)-ATPase 2 단백질은 건조 stress 로 인하여 48hrs에 감소하였다. (그림8, 9)

표2. 건조 stress 중 발현량에 큰 차이를 보이는 단백질.

Accession	Description	Average of C	Average of 24hr	Average of 48hr	P value
Bra027544	tubulin beta chain 4	3.8E-06	0.000937	0.002408	0.035374
Bra005012	delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase 1	3.8E-06	0.000984	0.002113	4.06E-05
Bra016644	heat shock protein 70B	3.8E-06	2.85E-06	0.001756	3.09E-11
Bra028345	S-adenosyl-1-homocysteine (SAH) hydrolase 2	3.8E-06	0.001753	0.001233	0.035493
Bra007179	delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthase 2	3.8E-06	0.000396	0.000822	0.026859
Bra014562	ketol-acid reductoisomerase	0.000427	0.000654	3.01E-06	0.038465
Bra031031	methylthioalkylmalate synthase-like 4	0.000429	2.85E-06	3.01E-06	1.04E-06
Bra001085	polyribonucleotide nucleotidyltransferase, putative	0.000467	7.37E-05	3.01E-06	0.01262
Bra007284	dicarboxylate diiron protein, putative (Crd1)	0.000832	0.000572	3.01E-06	1.46E-07
Bra024101	H(+)-ATPase 2	0.001642	2.85E-06	3.01E-06	4.52E-11

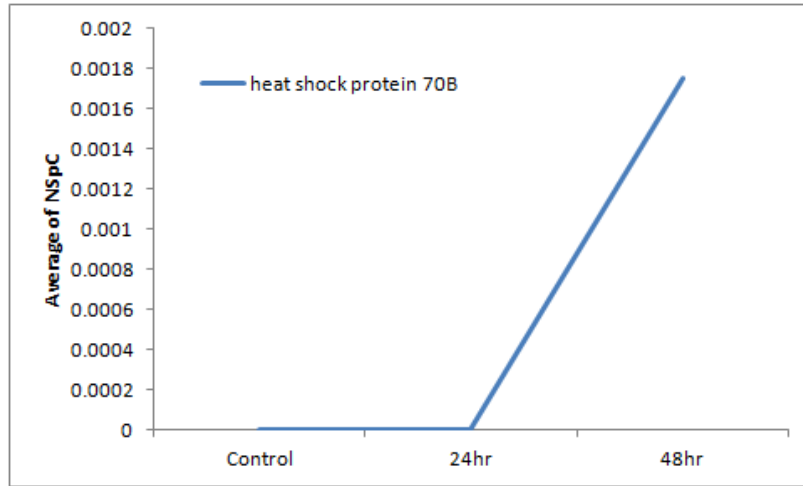


그림 8. 건조 stress처리에 따라서 증가하는 단백질

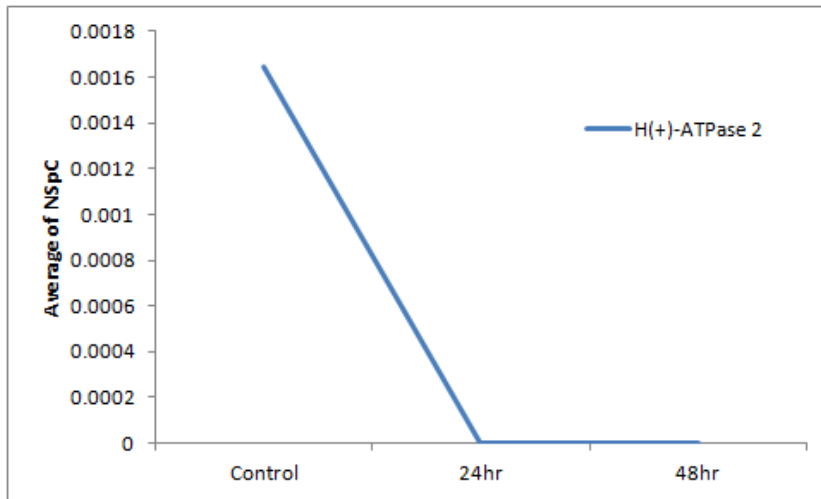


그림 9. 건조 stress처리에 따라서 감소하는 단백질

⑦ Clustering 분석

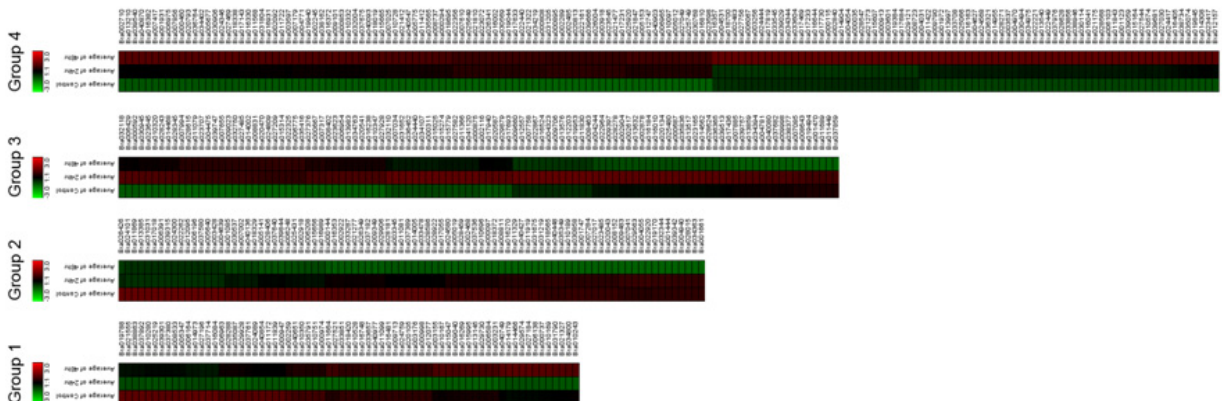


그림 10. Clustering analysis

특이발현 candidate proteins 440 개를 clustering 분석하였다. 분석된 단백질은 발현양상에 따라 총 4개의 group 으로 쪼개졌다.(그림 10) Group1 은 단백질의 발현양이 점차적으로 증가하여 48hr 에 가장 많은 발현량을 보인다. Drought 처리가 진행됨에 따라서 발현량이 증가하는 단백질로 대부분의 단백질들이 외부 자극에 반응하는 단백질들이다. 그 중 Bra008737/Bra034402/Bra036764;annexin1 와 같은 annexin 단백질이 각종 자극 (metal, osmotic, salt, cold temperature stimulus) 등에서 동일하게 나타났다. 배추 annexin 의 발현이 abiotic stress tolerance 를 향상 시킨다고 알려져 있고, Arabidopsis 에서도 annexin1이 osmotic stress에서도 중요한 역할을 한다는 것이 보고되어있다.

Group2 는 drought 처리가 진행될수록 발현량이 감소하는 경향을 보이는 단백질들이다. Pigment biosynthetic process 관련 단백질들이 감소하였는데 이것은 앞서 살펴본 morphologic 분석에서도 확인할 수 있다. Drought 처리가 진행되면서 관련 단백질의 발현량이 줄어든 것으로 보인다. 또한 Bra017055/Bra000144/Bra005019;rubisco activase와 같이 광합성에 관여하는 효소들도 drought stress 에 영향을 받았음을 알 수 있다.

Group3 는 24hr 에 그 발현량이 많은 단백질들이다. 특징적인 것으로 transcription factor 관련 단백질들이 다수 있었다. transcription factor DREB1A 를 overexpression 했을 때 이 TF가 drive 하는 각종 stress (drought, salt, freezing tolerance) 에 감응하는 DRE 의 발현량이 증가하여 외부 스트레스 tolerance 가 향상된다는 보고가 있다.

Group4 는 24hr 에 발현량이 잠깐 줄었다가 48hr 에 처음수준으로 회복된 단백질들이다. Translation 에 관여하는 단백질들이다.

2. 고온 stress 대응 단백질체 발현현상 탐색

가. 지부배추 고온 처리

- ① 공시재료: 지부배추
- ② 종자는 petri-dish에 침종하여 24시간 25℃에서 발아시켜 종자 하나당 하나의 pot에 이식했다.
- ③ 종자가 심겨진 화분을 Growth Chamber 내에서 25℃, 70%(Relative Humidity), 16hr day/8hr night 의 조건으로 3주간 매일 수분을 공하며 재배함.
- ④ 실험군에 사용될 배추는 14h day, 32 ℃/10h night, 22 ℃ 조건으로 고온 처리하였다.
- ⑤ 고온처리 직전 3주된 시료를 수확하여 대조구로 활용하고, 고온처리 24hr, 48hr후 각각 시료를 수확 하였다.



그림 11. 지부배추 유묘의 고온 stress 반응(Control, 24hr After Drought, 48hr After heat)

- 대조구의 유묘들은 잎이 정상의 모습이었으나, 24시간 고온 처리 후 잎이 약간 마르기 시작하였으며 한 두 잎에서 잎이 말리는 모습을 보였다. 48시간 후에도 24시간 처리한 표현형과 큰 차이는 보이지 않았지만 24시간 보다는 조금 더 마른 모습이었다.

나. 배추 잎 단백질 추출 및 1D-LDS PAGE 분석

① 배추 잎 단백질 추출

- 질소를 이용하여 막대사발로 배추잎을 곱게 갈아주어 세포벽을 파괴시킨 후, Urea buffer(8M Urea/5mM DTT/1% LDS/100mM Tris pH8.5)를 이용하여 단백질을 추출함.

② 2-D Quant Kit 을 이용한 배추 잎 단백질 정량

- 2-D Quant Kit(GE Healthcare)을 이용하여 단백질 발색반응을 기준으로 정량하였는데 Bovine serum albumin (BSA) standard solution의 발색반응을 회귀식으로 작성하여 정량하였다.

③ 단백질 전기영동 ; 1D-LDS-PAGE

- 추출된 배추 단백질을 50 μ g 씩 실험에 이용할 수 있도록 정량된 값을 이용하여 전기영동에 이용하였다.
- NuPAGE[®] Bis-Tris Mini Gels(novex by life technologies) (4~12%) 에 Sample(Sample/NuPAGE[®] LDS Sample Buffer(4X)/NuPAGE[®] Reducing Agent(10X)/Deionized Water) 을 Loading 하였다.
- 110mA에서 약 40~50 분간 전기영동을 하였다.
- 전기영동이 완료된 gel 은 Fixing Solution(Deionized Water 40ml/Methanol 50ml/Acetic Acid 10ml) 100ml에 10분간 fixing 하였다.
- Fixing Solution 을 잘 따라낸 후, Staining Solution(Deionized Water 55ml/Methanol 20ml/Stainer A 20ml,NOVEX[®] Colloidal Blue Stain Kit/Stainer B 5ml,NOVEX[®] Colloidal Blue Stain Kit) 에 넣어 gel을 staining 하였다.
- Staining 시에는 먼저 stainer A를 넣고 10분간 shake 한 후 stainer B 를 넣고 12시간 정도 staining 하였다.

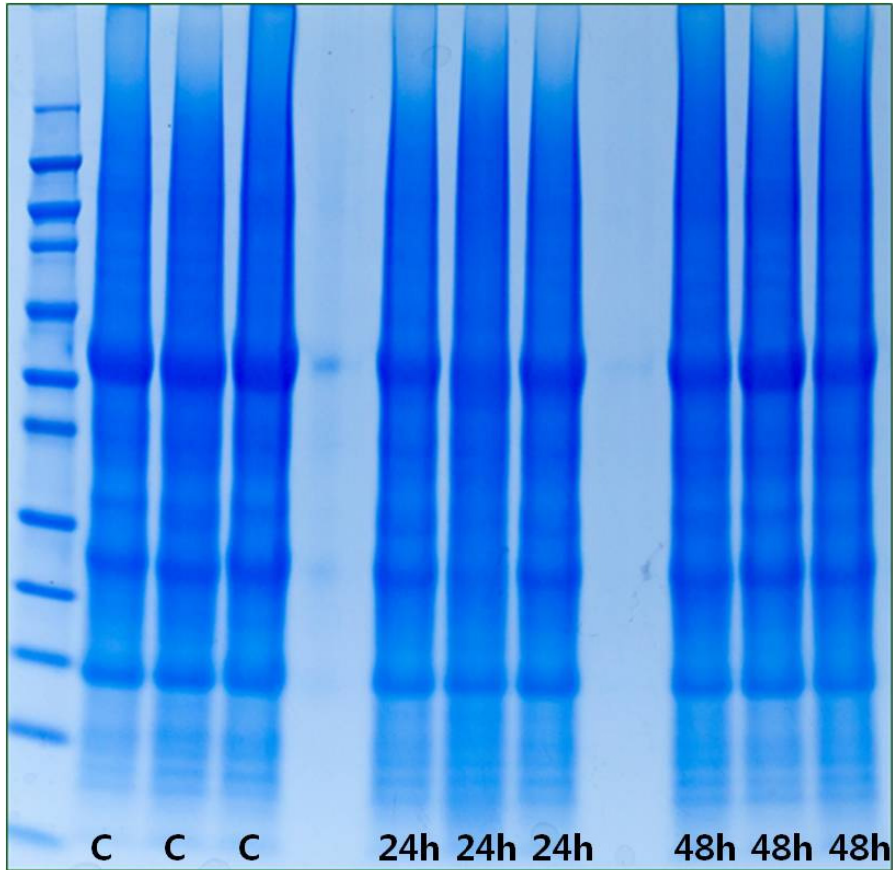


그림 12. 배추 고온처리 단백질체 1D-LDS-PAGE

c: control. 24h: 24hours after heat treatment, 48h; 48hours after heat treatment

- 1D-LDS-PAGE 로 분리 전개한 결과 전체 단백질이 (high molecular weigh~ low molecular weight protein) gel상에 넓게 분리되었다.
- 대조구와 24hrs, 48hrs에서 1D-LDS-PAGE 분석 결과, gel 상에서는 차이를 구분할 수가 없었다.

다. shotgun Proteomics 분석을 배추 잎의 건조 stress에 대응하는 단백질 탐색

①1D-LDS PAGE로 분리된 단백질의 동정을 하기위해 각 레인 (시료) 별로 7등분하여 In-gel-digestion 했다.

- 7 조각으로 잘린 각각의 조각을 약 1mm 정도의 정육면체로 잘게 썰어 1.5ml tube에 구분하여 담았다.(그림 13)

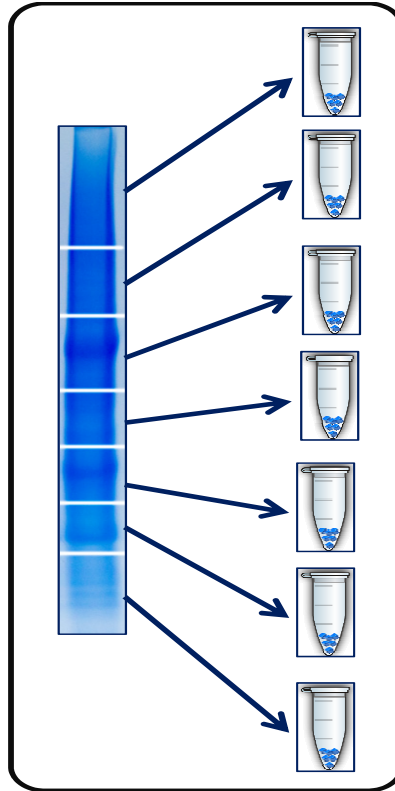


그림 13. shotgun proteomics 분석을 위한 gel slicing 방법.

- 각각의 tube에 destaining buffer(50% acetonitril(ACN) in 50mM ammonium bicarbonate(ABC) pH 7.8) 를 처리하여 Coomassie blue 염색을 제거하고, 각 gel에 포함된 단백질을 reduction (10mM DTT in 25mM ABC), alkylation (55mM iodoacetamide) 과정을 거친 후 trypsin digestion (trypsin 12.5ng/μl in 50mM ABC)을 한다.

②모든 분석시료에 대하여 digestion 된 peptide를 회수하였고 2014년 5~6월 질량분석기로 shotgun proteomics 분석을할 예정이며, 분석하여 동정된 단백질체 list 는 배추 잎 단백질체 database에 추가 할 것이다. 모든 단백질체에 대한 고온처리 반응에 대한 발현량을 비교하고 고온처리로 인한 특이발현 단백질을 선발할 것이고, 선발된 단백질들에 clustering 분석과 GO 분석을 하여 고온저항성 후보 단백질을 선발할 것이다.

6절 수박 고품량 라이코핀 분자마커 개발 및 이를 이용한 수박 품종개발 시스템 구축 (제 2-3 세부과제)

1. 고품량 라이코핀 유전자원 탐색

가. 유전자원 수집

라이코핀 함량이 높은 품종을 개발하기 위해서는 라이코핀 함량이 높은 유전자원을 찾고 그 특성을 한국적 재배환경에 적합하고 우수한 원예형질을 지닌 계통으로 도입하는 것이 필수적이다. 이를 위해 국내에 대표적으로 많이 재배되고 있는 품종에서 고품량 라이코핀 특성이 존재하는지 확인하기 위해 대표적인 품종들인 ‘삼복꿀’(몬산토), ‘마니다라’(신젠타) 그리고 ‘스피드플러스’(농우바이오)을 수집하였는데, 국내 수집된 품종은 단타원형으로 육색은 도홍색이었다. 그리고 기존에 보고된 연구결과에서 Hazera가 개발한 ‘Summer Flavor 810’, ‘Summer Flavor 710’ 등이 라이코핀 함량이 각각 75.4 $\mu\text{g/g}$, 82.3 $\mu\text{g/g}$ 으로 매우 높았다고 보고 (Perkins-Veazie, et al. 2006. Carotenoid content of 50 watermelon cultivars. J. of Agriculture and Food Chemistry. 54:2593-2597.)되어 이 품종을 육성소재로 이용하려 이메일을 보내 도입하려 노력하였으나 도입을 할 수는 없었다. 그리고 미국의 icebox 타입으로 5-6kg 원형과를 생산하는 OP 품종인 ‘Dixielee’라는 품종에서 매우 진한 적육색의 특성을 보이는데 이에 관련된 유전자는 scarlet red flesh color(*Scr*) 로 단인자 우성의 특성을 보이는 것으로 보고되었는데, 이 품종이 도입되어 육색은 매우 진하고 라이코핀 함량도 매우 높게 나타났다(표 1, 그림 3). 이 품종은 숙기가 약간 늦고 종자의 크기가 큰 노지재배용 OP품종이므로 한국적 재배환경에 적합한 원예적 형질을 갖고 있지는 못하지만, 육색이 매우 진하고 라이코핀 함량이 높아 육성소재로 유용할 것으로 판단된다. 그리고 ‘Whitewm’라 하여 과육이 백색인 고정종도 도입이 되었다.

표 1. 도입된 유전자원의 특성.

Plot	품종명	구 분	수집처	과형	과육색	과피색	과중(kg)
511	마니다라	F1	국내	단타원형	도홍	호피	7-9
512	스피드플러스	F1	국내	단타원형	도홍	호피	6-8
513	삼복꿀	F1	국내	단타원형	도홍	호피	7-9
519	Whitewm	OP	국외	원형	황백	호피	5-6
548	Dixielee	OP	국외	원형	적	호피	5-6

나. 도입 유전자원의 특성검정

(1) 도입 유전자원의 원예적 형질 조사

도입된 유전자원과 자사가 보유한 유용유전자원들에 대한 원예적 특성 평가는 자사의 비닐하우스와 유리온실에서 총 3차에 걸쳐 수행되었다. 1차는 도입유전자원 5점과 자사 보유한 우량계통 및 고품량 라이코펜 계통 13점 등 총 18계통을 공시하여 2009년 4월 21일 파종하여 5월 22일 정식되었고, 7월 27일 조사하였다. 2차는 자사보유한 고품량 라이코펜 계통 등 총 20계통을 공시하여 6월 11일 파종, 7월 3일 정식되었으며, 9월 10일 조사하였다. 마지막 3차는 라이코펜 함량이 다양한 8 계통을 공시하여 7월 20일 파종, 8월 12일 정식되었으며 10월 26일에 조사하였다. 도입된 5점의 유전자원에 대한 원예적 형질은 표 1에 나타나 있다. ‘삼복꿀’(그림 1)은 대표적인 단타원형 상용품종으로 당도가 높고 육색은 도홍색이다. 라이코펜 함량이 높을 것으로 판단되어 도입된 ‘Dixielee’(그림 3)의 경우에 호피가 있는 원형으로 5-6kg 정도로 과 크기는 약간 작았고, 당도는 약간 낮았으며, 육색은 매우 진하여 표 2에서 보여지는 바와 같이 라이코펜 함량이 $83.5\mu\text{g/g}$ 로 높게 나타났다. ‘Dixielee’는 이전의 연구결과에서 $64.77\mu\text{g/g}$ (Penelope Perkins- Veazie, 2004. In search of high lycopene watermelon. Cucurbit Genetics Cooperative Report. 27:51-53)과 $68.1\mu\text{g/g}$ (Perkins-Veazie, et al. 2006. Carotenoid content of 50 watermelon cultivars. J. of Agriculture and Food Chemistry. 54:2593-2597.)으로 높게 나타났는데 본 시험에서도 일반 품종보다 높은 것으로 측정되어 유사한 결과가 나타난 것을 확인하였다. ‘Whitewm’(그림 2)은 육색이 황백색인 호피가 있는 원형인 중과종 수박으로 라이코펜은 전혀 검출되지 않아 ‘Dixielee’와 극단적으로 대비가 되었다.



그림 1. 삼복꿀 수박의 과육색, 과피색 및 과형.



그림 2. Whitewm 수박의 과육색, 과피색 및 과형.



그림 3. Dixielee 수박의 과육색, 과피색 및 과형.

(2) 도입 및 보유유전자원의 라이코펜 함량 조사

(가) 분석방법

도입된 유전자원과 자사가 보유한 유용유전자원들에 대한 라이코펜 함량 측정은 원예적 특성 평가와 동시에 진행되어 총 3차에 걸쳐서 측정되었다. 원예적 특성 평가 및 종자수확과 동시에 이루어졌기 때문에 분석을 위한 시료채취는 분석의 일관성과 균일성을 위해 교배일과 과육색, 육질 등을 종합하여 과일의 숙기를 판단하여 적숙기에 다다른 과일을 대상으로 세로로 절단하여 과 중간과 태좌사이의 부분의 과육을 약 20g정도 채취하였다(그림 4). 채취된 시료를 동결 보관후 작물육종지원사업단에 분석을 의뢰하였다. 분석은 HP 1100 series HPLC(Hewlett Packard, USA)를 이용하였고, 분석 시, 시료 2g에 0.05g magnesium carbonate와 acetone:hexane(4:6) 100ml을 가하고 high speed homogenizer에서 고속으로 5분간 마쇄 추출하였다. 추출물을 Watman No.1 filter paper에 여과한 후 500ml 용량의 분액여두에 옮겼다. 10% sodium chloride 50ml로 2회 분배하여 수용액 층을 버리고, 다시 water 50ml로 2회 분배하여 수용액 층을 버렸다. 유기용매층을 20g의 anhydrous sodium sulfate층에 통과시켜 탈수시킨 후, 40도에서 감압 농축, 건조하였다. 잔류물을 2ml chloroform에 재용해하여 HPLC/UVD 공시액으로 하였다. 수박의 lycopene 함량이 높아 10배 희석하여 분석하였다.



그림 761. 라이코펜 함량 측정을 위한 시료채취 부위.

(나) 라이코펜 함량 1차

고함량 라이코펜 품종육성을 위해 도입된 유전자원 5점과 자사보유 계통 3점의 라이코펜 함량 분석결과는 표 2와 같다. 분석결과 자사가 보유한 DRD라는 계통의 라이코펜 함량이 134.3 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 과육색이 진한 쪽으로 계속 선발이 되어진 DRDSBB3라는 계통이 90.0 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 그리고 매우 진한 적육색을 지닌 OP품종으로 알려진 Dixielee의 경우에 83.5 $\mu\text{g/g}$ 로 역시 높게 나타났다. 상용 F1품종들은 라이코펜 함량이 큰 차이를 보이지 않았지만 그중에서 마니다라 품종의 라이코펜 함량이 약간 높아 61.8 $\mu\text{g/g}$ 를 보여주었다. 그리고 교배조합의 부계친으로 이용되고 있는 자사의 SBB라는 계통의 경우에 61.2 $\mu\text{g/g}$ 로 나타나 그다지 높은 편은 아니었다. 대표적인 유전자원들의 개체간의 라이코펜 함량이 그림 1에 나와 있는데, '삼복꿀'의 경우 개체간에 최고 64.3 $\mu\text{g/g}$ 에서 최저 46.1 $\mu\text{g/g}$ 로 최대 18.2 $\mu\text{g/g}$ 의 함량차이가 나타났지만 전반적으로 낮은 함량을 보여주었고, 라이코펜 함량이 가장 높은 'DRD'계통의 경우 149.4 $\mu\text{g/g}$ ~ 113.0 $\mu\text{g/g}$ 으로 개체간의 차이를 보였지만, 전부 매우 높은

함량을 보였으며, 'DRDSBB'의 경우 $117.1\mu\text{g/g} \sim 65.7\mu\text{g/g}$ 로 '삼복꿀'보다는 일관되게 높게 나타나 이들 두 계통은 라이코펜 함량에 대해서는 고정되어 고품량 라이코펜 특성을 도입하기 위한 재료로 유용할 것으로 판단된다(그림 5).

지금까지의 경험상 과육의 적색강도와 라이코펜 함량의 경우에 밀접한 연관이 되는 것으로 알려졌는데, 본 시험에서 사용된 연구재료에서도 육색의 강도가 매우 높은 계통에서 라이코펜 함량이 높은 것을 재확인 할 수 있었다. 그리고 Whitewm계통의 경우 과육색이 매우 연한 백색계통으로 라이코펜 분석결과 전혀 검출되지 않았다. 이번의 결과로 볼 때 현재 한국에서 재배되고 있는 품종들의 라이코펜 함량은 $60.0\mu\text{g/g}$ 내외로 그다지 높은 편이 아니었고, 자사보유 계통과 도입계통의 일부에서 매우 높은 라이코펜 함량이 발견되어 이들 재료를 이용하면 한국적 재배환경에 적합한 고품량 라이코펜 품종개발이 가능할 것으로 판단된다.

표 2. 도입 및 보유계통과 주요 품종의 라이코펜 함량(1차분석).

Sample	Name	Lycopene ($\mu\text{g/g}$)	Sample	Name	Lycopene ($\mu\text{g/g}$)
511	마니다라	61.8 ± 8.5	517	DRDSBB3	90.0 ± 14.7
512	스피드플러스	56.6 ± 16.8	518	SBB	61.2 ± 9.7
513	삼복꿀	53.6 ± 6.9	519	Whitewm	0.0 ± 0.0
514	DRD	134.3 ± 19.0	548	Dixielee	83.5 ± 9.0

(다)라이코펜 함량 2차 분석

표 3에는 자사가 보유하고 있는 다양한 계통들 중에서 고품량 라이코펜 품종개발에 직접 또는 재료로 이용할 수 있는지를 알아보기 위해 라이코펜 함량 분석을 실시한 결과이다. 분석을 위한 시료채취는 2009년 8월 20일에 실시하였고, 이후 과정은 동일하였다.

표 3-1. 삼복꿀, DRD, DRDSBB 수박의 라이코펜 함량.

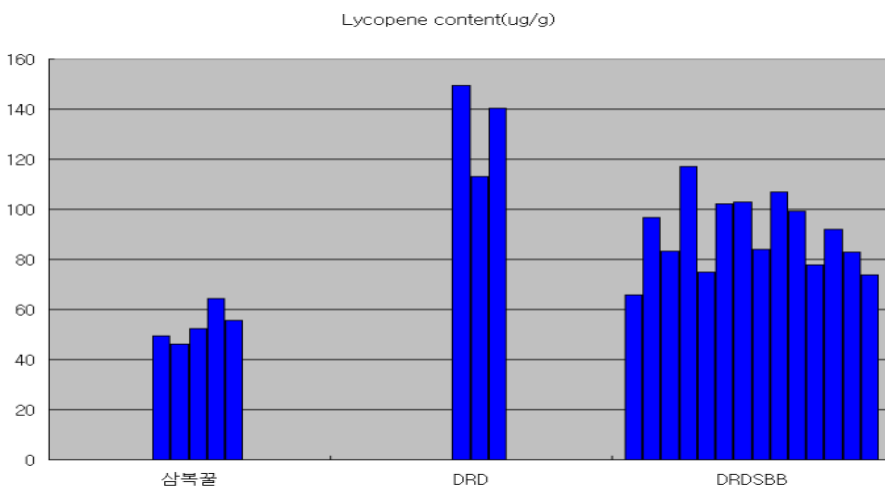


표 3-2. 도입 및 보유계통과 주요 품종의 라이코펜 함량(2차분석).

Sample	Name	Lycopene($\mu\text{g/g}$)	Sample	Name	Lycopene($\mu\text{g/g}$)
819	DR01	23.7	829	DR11	119.8 \pm 32.9
820	DR02	42.2 \pm 27.7	830	DR12	97.9 \pm 42.3
821	DR03	23.8 \pm 3.8	831	DR13	64.8 \pm 26.4
822	DR04	74.5 \pm 25.0	832	DR14	129.5 \pm 53.5
823	DR05	67.9 \pm 29.2	833	DR15	45.8 \pm 4.6
824	DR06	49.1 \pm 27.7	834	DR16	81.3 \pm 37.0
825	DR07	64.7 \pm 41.1	835	DR17	58.5 \pm 24.7
826	DR08	56.5 \pm 19.1	836	DR18	26.4 \pm 9.9
827	DR09	74.4 \pm 35.4	838	DR20	21.9 \pm 0.3
828	DR10	94.7 \pm 48.7			

그러나 이번 분석 시 냉동 보관하였던 시료가 보관상의 문제로 인해 해동되었다가 재 냉동된 시료를 이용하여 계통 내 개체 간의 편차가 1차 시료보다는 커진 결과를 보여주었다. 이번 결과를 통하여 자사가 보유한 중과중 원형계 계통인 'DR14', 육색이 진한 짙은 녹색 장형계통인 'DR11'계통에서 라이코펜 함량이 각각 129.5 $\mu\text{g/g}$ 와 119.8 $\mu\text{g/g}$ 의 함량을 보여주어 고품량 라이코펜 품종육성을 위한 좋은 재료로 활용될 것으로 판단되었다. 그리고 기존의 단타원형 수박 조합의 모계의 대표적인 특성을 보여주는 'DR01', 'DR03' 계통은 각각 23.7 $\mu\text{g/g}$, 23.8 $\mu\text{g/g}$ 로 매우 낮게 나타났다. 이러한 계통들에 고품량 라이코펜 특성을 도입한다면 원예적 특성이 우수한 고품량 라이코펜 품종개발도 가능할 것으로 판단된다. 또한 지난 1차 라이코펜 분석 시 이용되었던 'SBB'계통과 그 특성이 매우 유사한 'DR15'계통의 경우 45.8 $\mu\text{g/g}$ 로 약간 낮게 나타나 재배시기 및 환경에 따라 라이코펜 함량은 시기 별로 조금씩 차이를 보이는 것으로 판단되었다.

표 4 에는 자사가 보유하고 있는 다양한 계통들 중에서 고품량 라이코펜 품종개발에 직접 또는 재료로 이용할 수 있는지를 알아보기 위해 13계통에 대하여 추가로 라이코펜 함량 분석을 실시한 결과이다. 분석을 위한 시료채취는 2009년 10월 20일에 실시하였고, 이후 분석과정은 1차와 동일하게 진행하였다. 이번 분석결과 전반적으로 이전의 결과들과는 다르게 낮은 수준의 라이코펜 함량이 관찰되었다. 그 원인으로써 재배시기에 따라 라이코펜 함량이 달라졌을 가능성, 샘플링 또는 분석의 오류 가능성 등이 있을 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 모계친으로 이용되는 'DR23'의 경우 함량이 매우 낮게 나타났고, 육색이 진하여 라이코펜 함량이 높을 것으로 판단되는 'SL0975'와 'SL0976'의 경우에는 47.0 $\mu\text{g/g}$ 와 38.5 $\mu\text{g/g}$ 으로 높게 나타나 전반적인 경향은 육색의 진한 정도에 따라 라이코펜 함량이 관계가 높은 이전의 분석결과와 동일한 결과를 보여주었다. 'SL0975'와 'SL0976'은 육색이 진한 타원형 수박으로 원예적 형질이 우수하여 라이코펜 함량이 높은 품종개발에 직접적인 친으로 이용이 가능할 것으로 판단되었다.

표 4. 도입 및 보유계통과 주요 품종의 라이코핀 함량(3차분석).

Sample	Name	Lycopene($\mu\text{g/g}$)	Sample	Name	Lycopene($\mu\text{g/g}$)
903	SL0903	25.4 \pm 3.5	1184	DR106	34.3
906	SL0906	26.1 \pm 8.6	1185	DR107	29.5
975	SL0975	47.0 \pm 3.8	1186	DR108	22.2 \pm 2.2
976	SL0976	38.5 \pm 10.6	1187	DR109	22.2
1101	DR23	15.6 \pm 0.9	1188	DR110	19.3
1102	DR24	14.8	1189	DR111	25.7 \pm 2.7
1183	DR105	13.3 \pm 4.8			

2. 고품량 라이코핀 계통개발

가. 1차년도 F1조합작성 및 분리세대 양성

한국적 재배환경에서 우수한 특성을 지닌 고품량 라이코핀 수박을 개발하기 위해서는 기존의 우수품종이 가지고 있는 우수한 원예적 형질은 그대로 가지면서 라이코핀 함량이 높은 계통을 만드는 것이 필수적이다. 따라서 현재 일부 계통에서 보이는 높은 라이코핀 특성을 자사가 보유하고 있는 우량계통에 여교잡의 방법으로 최대한 단기간 내에 도입하려는 목표에 따라 표 5와 같이 자사에서 기존의 품종개발에 사용된 계통들을 선정하여 고품량 라이코핀 특성을 도입하려고 한다. 이에 따라 현재 자사의 주요 품종의 양친으로 사용되고 있는 12 계통들을 선정하여 이들 계통과 라이코핀 함량이 높은 라이코핀 함량이 가장 높은 'DRD'계통, 그리고 라이코핀 함량이 높으면서 호피장형으로 원예적형질도 우수한 'DRDSBB'와 각각 교배하여 총 24개의 F1을 작성하였다. 이렇게 작성된 조합 중 'DRD' 계통과 작성된 9개의 F1조합들과 그 계통들은 태국 Khonkaen지역에 건기작형에 공시하여 2009년 10월 23일 파종, 11월 5일 정식하여 2010년 1월 8일에 F2 및 BC1F1(P1)을 작성하였다. 라이코핀 함량과 육색의 진한 정도는 밀접한 관계를 보이는 것으로 알려져 있으며, 태국 건기작형에서도 유사한 결과를 나타내었다. 그림에서 보듯이 '환 1' 과 'DRD' 계통의 F1인 '환 1 \times DRD'의 경우에는 과피색, 과형 등 여러 형질들이 '환 1' 과 'DRD' 의 중간적인 특성을 보이며, 특히 과육색의 경우 '환 1'에 비해 매우 짙은 육색을 보여 육색은 공동우성 또는 우성의 특성을 보이는 것으로 확인되었다(그림 5).

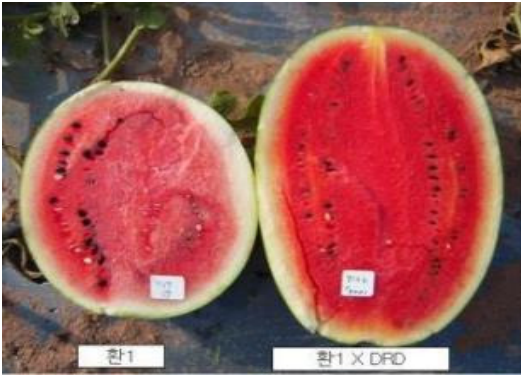


그림 5. 환 1 계통과 환1 × DRD 계통의 과형 및 과육색.

그리고 라이코핀 함량 측정결과 함량이 높게 나온 DR04, DR09, DR10, DR11, DR12, DR16, DRDSBB, SL0975, SL0976 계통들은 라이코핀 함량과 원예적 형질 등에 따라 20개의 F1조합을 작성하였다. ‘DRD’ 계통은 라이코핀 함량은 가장 높았으나, 육질이 매우 연하여 직접 이용은 힘들 것으로 판단되어 조합작성에서 제외하였다. 이렇게 작성된 조합들은 2010년에 자사포장 및 장외포장에 시험재배를 통해 특성을 검정하였다.

나. 라이코핀 마커개발용 집단 양성을 위한 F1, F2 작성
 고품량 라이코핀 특성을 도입하기 위해 선발된 자사 보유 우량계통의 특성은 표 5와 같다.

표 5. 고품량 라이코핀 특성 도입을 위해 선정된 우량 계통들.

Plot	품종명	과형	과육색	과중(kg)	과피색	구분
501	환1	원형	도홍	6-8	호피	모계형
502	삼농	원형	도홍	6-8	호피	모계형
503	JOA	원형	도홍	6-8	호피	모계형
504	NongA	원형	도홍	6-8	호피	모계형
505	PNB	원형	도홍	6-8	호피	모계형
506	Wangbul	원형	도홍	6-8	호피	모계형
507	W622B	타원형	홍	6-7	호피	부계형
508	Wangbul(1)	타원형	홍	6-7	호피	부계형
509	삼장농	타원형	홍	6-7	호피	부계형
510	SCNM	타원형	홍	6-7	호피	부계형
511	감천T	타원형	홍	6-7	호피	부계형
512	무등	원형	도홍	6-8	호피	부계형

3. 라이코핀 마커개발용 집단양성

가. 라이코핀 분자마커 개발용 집단 양성

라이코핀 마커 개발을 위한 BSA분석 및 마커유용성 확인집단을 양성하기 위해 2개의 분리집

단을 선발하여 각각의 양친과 F1, 분리세대를 전개하여 DNA추출, 라이코핀 함량 분석을 실시하였다. 집단 1은 SBB(P1, 라이코핀 함량 61.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$)와 DRDSBB(P2, 라이코핀 함량 90.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$)의 분리세대로서 SBB는 장타원형 호피수박으로 라이코핀 함량이 보통의 수박이고 DRDSBB는 SBB와 DRD의 여교잡을 통해 육색이 진한 쪽으로 선발해온 과형태와 특성은 매우 유사하지만 라이코핀 함량은 높은 특성을 보이는 계통(BC4F2)이다(표 6, 7).

표 6. 라이코핀 마커개발용 집단 1(BC4F2)의 양친특성

계통명	육색	과형	과중 (kg)	숙기	과피색	육색	라이코핀 함량 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
SBB	적육	장타원형	6-8	조	호피	적색	61.2
DRDSBB	극적육	장타원형	6-8	조	호피	진한적색	90.0

표 7. 라이코핀 마커개발용 집단1 F2의 라이코핀 함량 및 표현형

하위그룹			중위그룹			상위그룹		
개체 번호	라이코핀 함량	표현형 ^Z	개체 번호	라이코핀 함량	표현형 ^Z	개체 번호	라이코핀 함량	표현형 ^Z
8	39.0	3	12	82.3	5	3	168.4	7
7	45.5	5	1	97.1	3	20	168.6	5
16	55.8	5	10	98.2	5	18	169.8	5
9	59.0	5	15	110.1	3	21	179.9	7
			11	116.1	7	4	187.8	7
			19	123.0	3			
			24	126.6	3			
			6	151.1	5			
			17	154.8	3			
			13	155.3	7			

Z: 3:적육, 5:진한 적육, 7:매우 진한 적육

이 두 양친간의 F2를 전개하여 표현형과 라이코핀 함량을 조사한 결과는 표 7와 같다. 라이코핀 함량의 분석을 통해 라이코핀 함량이 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 미만인 그룹, 라이코핀 함량이 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이상 160 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 미만인 그룹, 160 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이상인 그룹으로 구분할 수 있었으며, 육색으로 판단한 표현형과 라이코핀 함량은 완전히 일치하지는 않았지만, 하위그룹에는 표현형이 3과 5인 개체들이 포함되었고, 상위그룹에는 표현형이 5와 7인 개체들이 포함되었다. 각 그룹의 평균 라이코핀 함량은 각각 49.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 121.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 174.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었다. 이 분리집단의 라이코핀 함량의 분석결과 양적인 형질과 유사한 특성을 보이지만 라이코핀 함량은 숙기, 시료채취부위, 재배환경 등에 의해 영향을 보이는 것이기 때문이라 판단된다.

표 8. 라이코핀 마커개발용 집단 2의 양친특성

계통명	육색	과형	과중(kg)	숙기	과피색	육색	라이코핀 함량 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
환1	도홍육	원형	8-10	만	호피	도홍색	77.3
DRD	극적육	장형	7-9	조	크림슨	진한 적색	134.3

집단 2는 환1(P1, 라이코핀 함량이 보통인 수박)와 TSDRD(P2, 라이코핀 함량 134.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$)의 분리세대로서 P1은 원형 호피 수박으로 숙기가 늦은 모계형의 수박으로 육색은 도홍색이며, P2는 장타원형 크림슨 수박으로, 숙기가 빠른 부계형 수박으로 육색이 매우 진한 적육색 계통이다(표 8).

나. 고품량 라이코핀 연관 마커 분석을 위한 관련 계통 라이코핀 함량 분석

고함량 라이코핀 연관마커를 탐색하기 위해서 표 9와 같은 재료에 대해 라이코핀 함량을 분석하였다. 라이코핀 함량은 숙기 및 재배상태 등에 따라서 달라질 수 있으므로 라이코핀 관련 유전자에 대한 영향 이외의 변수를 제거하기 위해서 Near Isogenic Line을 육성하여 라이코핀 마커탐색에 이용하였다.

저함량 계통 : 분석에 이용된 계통은 SBA로써 대표적인 반축성작형 품종의 모계로 사용되는 계통으로 숙기가 늦은 도홍색으로 과육색은 연하다.

고함량 계통 : 고함량 라이코핀 계통은 SBA에 고함량 라이코핀 계통(DRD)와 교잡한 후 여교잡을 2회 수행한 후, BC2에서 고정된 계통으로 대부분의 특성은 SBA와 유사하고 과육색이 매우 진한 계통이다.

F1 : SBA와 DRDSBA BC2F5 간의 F1 계통이다.

F2 : SBA와 DRDSBA BC2F5 간의 F2 계통으로 결과적으로 BC3F2의 분리세대를 라이코핀 연관마커분석에 활용하였다.

표 9. 라이코핀 함량 분석에 이용된 재료 및 그 특성

번호	계통명	구분	세대	조사 과수	특성(평균)			
					라이코핀함량	과중(kg)	당도(Brix)	육색 ^z
1301	SBA	저함량	고정(P1)	3	45.3	12.1	10.5	5
1423	DRDSBABC2F5	고함량	고정(P2)	3	55.4	10.0	12.5	7
1422	DRDBC2F5 × SBA	BC3F1	F1	3	47.3	12.2	11.3	6
1421	DRDSBABC3F2	BC3F2	F2	70	55.2	11.6	11.1	5.9

z: 숫자가 높을수록 과육색이 진함

다. 고함량 라이코핀 연관 마커 분석을 위한 계통 및 분리세대 라이코핀 함량 분석 결과 2012년 비가립작형에서 수행된 라이코핀 관련 특성 결과는 이전 년도들의 분석 결과와는 다른 양상을 보였다. 육안으로 관찰한 과육색의 정도는 P1에서는 5, P2에서는 7, F1에서는 6으로 예상과 맞는 결과를 보여주었지만, 라이코핀 함량분석에서는 저함량 계통인 P1에서 45.3, 고함량 라이코핀 계통인 P2에서는 55.4로 계통간의 차이가 그리 크게 나타나지 않았다. 그리고 중간 정도의 육색을 보이는 F1에서 47.3으로 저함량 계통과 유사한 정도를 보여주어 과육색의 결과, 그리고 예상결과와 부합하는 분석결과를 얻지 못하였다. 이전 연도들의 라이코핀 결과를 참고하면 함량의 절대적인 차이는 분석 시기 등에 따라 다르지만 고함량 계통은 저함량 계통보다 50~150% 정도 더 높은 함량을 보여주었는데, 2012 년도의 결과는 육색의 차이가 확연히 나타나는 계통들 간의 라이코핀 함량차이가 적게 나타났다. 라이코핀 함량의 결과는 숙기, 착과 후 일수, 환경 등에 의해 달라질 수 있지만, 이번 경우처럼 함량의 차이가 적어지는 뚜렷한 이유는 파악하지 못했다.

F2에서 과육색의 진한 정도, 라이코핀 함량, 당도, 과중 등에 대한 자료는 표 10에 나타나있다.

표 10. BC2F2집단의 개체별 라이코핀 함량 분석결과 및 과특성

개체 번호	라이코핀 함량($\mu\text{g}/\text{mg}$)	착과일	과중 (kg)	당도 (Brix)	육색	비고	분석적합
1	55.4	1	8.8	10.4	-		
2	61.0	1	13.5	13	7	공동	
3	51.1	1	9.5	10.4	6		1
4	53.5	1	6.4	11	6		1
5	55.2	4	11.2	11.4	6		1
6	63.0	1	10.1	11.6	7	공동	
7	51.9	4	12.9	10.6	7		1
8	24.3	1	11.3	10.4	5	공동, 과숙	
9	53.5	4	13.1	11	7		1
10	68.6	3	11.5	11.4	7		1
12	66.9	1	11.2	12	6		1
14	41.5	3	10	8.8	5		1
15	40.8	1	12	11.8	7		1
16	98.8	1	10.2	12.6	6		1
17	58.0	2	14	12	7		1
18	55.6	2	14.1	12	7		1
19	46.3	1	9.7	11.4	5		1
21	47.0	1	10.9	9	6		1
22	42.4	1	11.6	10.4	7		1
24	67.2	3	10.1	11.4	6		1
25	50.5	1	12.5	12	7		1
26	60.9	교배안됨	14	10.4	3	미숙	
27	33.0	1	10.5	11.4	5		1
30	51.8	1	10.2	11.6	7		1
31	59.3	4	13.4	10.4	6		1
32	55.8	2	11.9	10.4	6		1
33	60.3	교배안됨	10.4	11	5		
34	36.6	1	12.4	13.6	7	공동	
36	97.9	교배안됨	10.6	10.8	5		
37	51.3	3	11.7	11.6	5		1
38	45.8	교배안됨	12.7	10.2	5		
39	42.5	1	9.2	12.4	7		1
40	42.6	1	13.1	9.6	6		1
41	30.9	4	13	11.4	5		1
42	51.6	2	12.6	10.2	7		1
43	55.1	교배안됨	13.7	9.6	5		
44	66.1	3	15.3	10.6	6		1
45	39.9	1	11.8	10.6	6		1
46	51.2	3	13.3	11	3		
47	45.5	2	10.3	11.6	5		1
48	57.7	4	12.3	12.2	6		1
49	43.8	1	8.3	13	7	비대약	
50	77.4	3	13.2	10.8	7		1
51	63.7	교배안됨	6.2	12	7	비대약	
52	47.7	3	8.1	12	7	비대약, 과숙	
53	42.3	1	14	12	7		1

개체 번호	라이코핀 함량($\mu\text{g}/\text{mg}$)	착과일	과중 (kg)	당도 (Brix)	육색	비고	분석적합
54	54.3	교배안됨	11.5	10.6	5		
55	49.7	1	10.2	10.8	7		1
58	36.1	1	10.2	12	7		1
59	87.7	교배안됨	12.1	11.4	6		
60	60.6	4	11	11.2	7		1
61	71.5	3	11.8	12.4	7		1
63	49.7	1	10.3	11.2	6		1
64	49.3	2	10.2	8.6	6		1
65	44.6	교배안됨	13.6	11.4	6	공동	
66	69.0	3	13.9	10.4	6		1
67	48.7	3	11.4	10	6		1
68	92.8	4	11	11.2	5		1
69	46.6	1	12.1	11.2	6		1
70	-	1	11.5	11.8	6	라벨누락	
71	42.2	교배안됨	10.9	9.8	5		
72	42.3	1	12.2	12.6	6		1
73	79.8	교배안됨	14.3	11.4	5		
74	51.0	2	12.9	10.8	7		1
75	63.4	3	14.8	11.8	6		1
76	48.8	3	11.5	8.6	5		1
77	72.0	4	10.6	9	3	미숙	
78	53.2	1	12.5	10.8	6		1
79	72.2	교배안됨	13	11.4	6		
80	61.9	4	13.6	10.6	5		1

F2에서 라이코핀 함량분석은 착과가 된 총 70개체에 대하여 수행하였다. 이 F2에서 착과일수가 명확하고, 과비대가 정상적으로 이루어지고, 공동, 미숙 등 비정상적인 과육 특성을 보이지 않은 48개체에서 과육색 특성에 따른 라이코핀 함량, 과중, 당도 등의 평균결과는 표 11과 같다.

표 11. 과육색에 따른 라이코핀 함량, 과중, 당도 특성

특성	과육색지수		
	5	6	7
F2개체수	9	21	18
라이코핀	50.2	56.3	53.1
과중	11.3	11.7	12.1
당도	10.7	10.9	11.4

분석에 적합한 48개체들에서 과육색이 5인 집단에서 평균 라이코핀 함량은 $50.2\mu\text{g}/\text{mg}$, 6의 경우 $56.3\mu\text{g}/\text{mg}$, 7의 경우 $53.1\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 과육색의 강도와 라이코핀 함량결과는 서로 부합하지 않았다. 과육색에 따른 과중 및 당도 특성에서는 과육색이 진할수록 약간씩 증가하는 경향이 있었지만, 경험상 이 결과는 유의미하다는 판단은 되지 않았다. 고품량 라이코핀 품종의 육성의 과정에서 과육색의 강도로 선발해왔고, 또 그에 대한 라이코핀 함량 분석결과는 전년도까지 어느 정도 예상과 부합되는 결과를 얻었던 것으로 판단하면 과육색에 따른 계통 및 조합의 선발은

매우 정확하다는 것이 검증되었기 때문에 과육색의 특성과 다르게 나타난 본 라이코핀 함량 분석 결과는 크게 신뢰도가 높은 것으로는 판단되지 않아, 본 시험의 결과를 통하여 분리세대를 라이코핀 함량의 차이에 따라 그룹을 나눠 Bulked Segregant Analysis를 수행하는 것은 무의미하다는 판단이 들어 성분분석을 통한 연관마커탐색을 진행하지 않았고, candidatet gene search가 적합하다는 판단을 하였고 그에 따라 primer set를 제작하였다(마커분석 결과 참조).

표 12. 라이코핀 마커개발용 집단2 F2의 라이코핀 함량 및 표현형

하위그룹			중위그룹			상위그룹		
개체 번호	라이코핀 함량	표현형 ^Z	개체 번호	라이코핀 함량	표현형 ^Z	개체 번호	라이코핀 함량	표현형 ^Z
36	34.2	3	14	61.5	5	32	103.0	3
4	40.2	7	21	63.7	3	35	105.4	5
39	43.5	7	26	69.3	3	30	108.4	5
27	49.4	3	23	70.0	7	16	118.2	7
11	51.8	7	38	73.2	5	31	119.2	7
24	53.7	5	37	74.8	5	1	119.4	3
12	53.7	7	29	78.4	7	18	152.7	5
28	55.0	5	19	80.5	3	3	194.1	5
7	55.0	3	20	81.2	7			
6	57.3	5	34	81.7	3			
			22	92.1	5			
			17	93.8	5			
			33	95.2	5			

Z : 3:적육, 5:진한 적육, 7:매우 진한 적육

집단 2의 라이코핀 함량 분석과 과육색 표현형 특성은 표 12와 같다. 집단 2는 원형 호피 모계와 타원형 크림슨 부계 계통간의 집단이므로 F2에서 과형 및 과피색, 숙기 등에 대해서 매우 다양한 분리 양상이 나타났으며, 라이코핀 함량의 경우에도 최저 34.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 부터 최고 194.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 개체 간에 연속적인 변이를 보여주었다. 마커개발을 위해 인위적으로 라이코핀 함량에 따라 하위, 중위, 상위 3그룹으로 나누었고, 그룹의 평균 라이코핀 함량은 각각 49.4, 78.1, 127.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었다. 각 그룹 내 개체들의 과육색 표현형은 그룹 1과는 다르게 매우 다양하게 나타났으며, 라이코핀 분석 결과와는 일치하지 않는 경우가 많았다. 이는 과형, 숙기 등 양친의 특성의 차이가 라이코핀 함량에도 영향을 주었고, 육안으로 관찰한 표현형도 성숙일수, 재배환경에 의해 영향을 받은 것으로 판단되므로 분자마커를 통한 유전형에 대한 선발지표가 필요하다는 것을 다시 한 번 보여주고 있다.

4. 고품량 라이코핀 분자마커 개발

가. 2차년도 라이코핀 마커 개발용 재료

고함량 라이코핀 계통으로 DRD, 저함량 라이코핀 계통 : SBB, SBA, 45NC, NT, 그리고 고

함량 라이코핀 계통을 공여친, 저함량 라이코핀 계통들을 반복친으로 하는 고품량 라이코핀 여교잡 계통(NIL) 7 계통을 마커분석을 위한 pannel로 사용하였다(표 13). 이 들 재료들은 BC2 ~ BC3 세대를 거치는 동안 반복친과 원예적 형질은 유사하면서 과육색이 진한 개체를 선발하였으므로, 여교잡 계통들의 염색체가 라이코핀 관련 유전자 부위의 염색체 일부는 DRD를, 나머지 전 염색체 부위에서는 저함량 라이코핀 계통(반복친)들의 염색체를 가지는 NIL로서 마커 개발에 유용한 재료로 유용하였다.

표 13. 분자마커 개발에 사용되고 있는 계통 및 NILs(Near isogenic lines)

번호	계통명	세대	비고
1	Dixilee	고정종	고정종으로 라이코핀 함량이 높음
2	DRD	고정계통	고함량 라이코핀 Source
3	SBB	고정계통	저함량 라이코핀 Source
4	DRDSBB3-4 × SBB	BC4F1	고함량 라이코핀 조합
5	DRDSBB3	BC3F4	SBB를 4번 Back cross한 NIL
6	SBA	고정계통	저함량 라이코핀 Source
7	DRDsbaBC2F5	BC2F5	SBA를 3번 back cross 한 F5 NIL
8	45NC	고정계통	저함량 라이코핀 Source
9	DRD45ncBC3F3	BC3F3	45NC를 4번 BC한 F3 NIL
10	NT(2X)	고정계통	저함량 라이코핀 Source
11	DRDNT(2X)BC2F5	BC2F5	NT(2X)를 3번 BC한 F5 NIL
12	환1	고정계통	저함량 라이코핀 Source

나. 2차년도 연관마커 분석

고함량 라이코핀 연관마커개발을 위하여 총 12개 DNA sample pannel에 대해 200개 RAPD primer, 16개 AFLP primer combination, 48 SRAP primer를 분석하였고, 분석 결과에서 나타난 다형성들 중에서 DRD를 포함한 여교잡 계통과 저함량 라이코핀 계통 간 다형성 마커를 찾고자 실험을 수행하였다.

총 검정된 마커(유전자좌, loci) 수는 12개 개체별 2,320 ~ 2,483이며, 개체 간 다형성을 보인 마커 수는 77 개로서 약 3.2%의 매우 낮은 다형성율을 보였고(표 9), 이 들 77개 마커 중 32개 마커가 특정 고함량 여교잡 계통(NIL)과 저함량 반복친 계통 간 다형성을 보여 특정 집단에서는 고함량 라이코핀 개체선발에 유용한 마커로서의 가능성을 보였다(표 14).

표 14. 라이코핀 함량 계통들을 3개의 마커타입으로 분석한 결과

마커타입	분석된 마커(loci) 수	개체 간 다형성인 마커 수	라이코핀 연관 마커 수
RAPD	1241~1261	34	8
AFLP	525~565	12	7
SRAP	554~657	31	17
Total	2320~2483	77	32

표 15. 각 마커별, 여교잡 계통별 다형성을 보이는 마커 수.

여교잡 계통 ^Z	RAPD	AFLP	SRAP
SBB	5	2	2
SBA	-	2	5
45NC	-	-	-
NT	1	-	4
SBB, SBA	-	1	4
SBB, 45NC	-	-	-
SBB, NT	-	-	2
SBA, 45NC	-	-	-
SBA, NT	-	-	-
45NC, NT	2	2	-
SBB, SBA, 45NC	-	-	-
SBB, SBA, NT	-	-	-
SBB, 45NC, NT	-	-	-
SBA, 45NC, NT	-	-	-
SBB, SBA, 45NC, NT	-	-	-

Z:고 함량 라이코핀 여교잡 계통의 반복친(저함량) 계통으로 사용되었던 계통명을 여교잡계통명으로 대신하여 표기하였음. 즉 SBB는 DRD × SBB의 BC3F4 계통(DRDSBB3)임.

하지만, 모든 4개 여교잡 계통들과 이들의 반복친 간 동시에 다형성을 보이는 마커는 얻을 수

없어, 타겟 형질에 매우 가깝게 연관되어 다양한 집단에 전반적으로 적용될 수 있는 마커를 찾는 것은 현재 연구의 마커 수로는 한계가 있었으며(표 15), 다형성 마커 중 2개 이상의 여교잡 계통과 이들의 반복친 간 동시에 다형성을 보이는 마커 11개가 선발되었다.

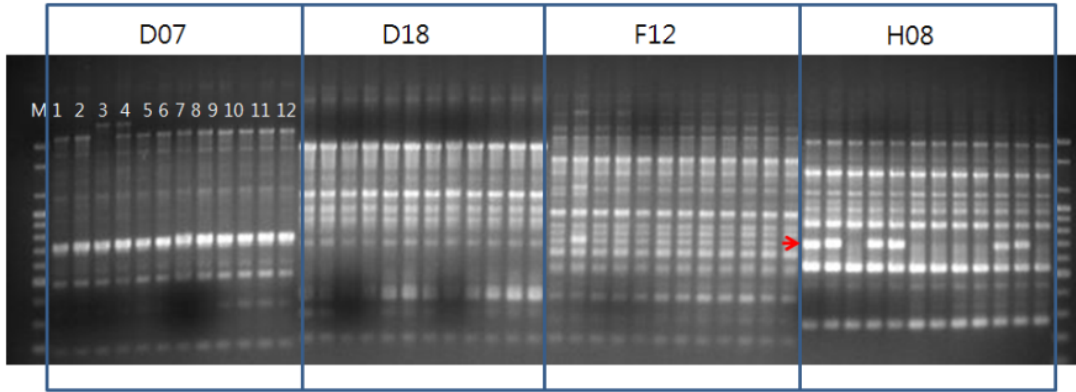


그림 6. 4개의 RAPD primer 마커 검정 결과를 보여주는 아가로스 젤 이미지. RAPD primer H08으로부터 SBB를 반복친으로 한 여교잡 계통과 SBB간 다형성인 마커 H08-650(붉은색 화살표).

FAM #10(100)-SBA,108

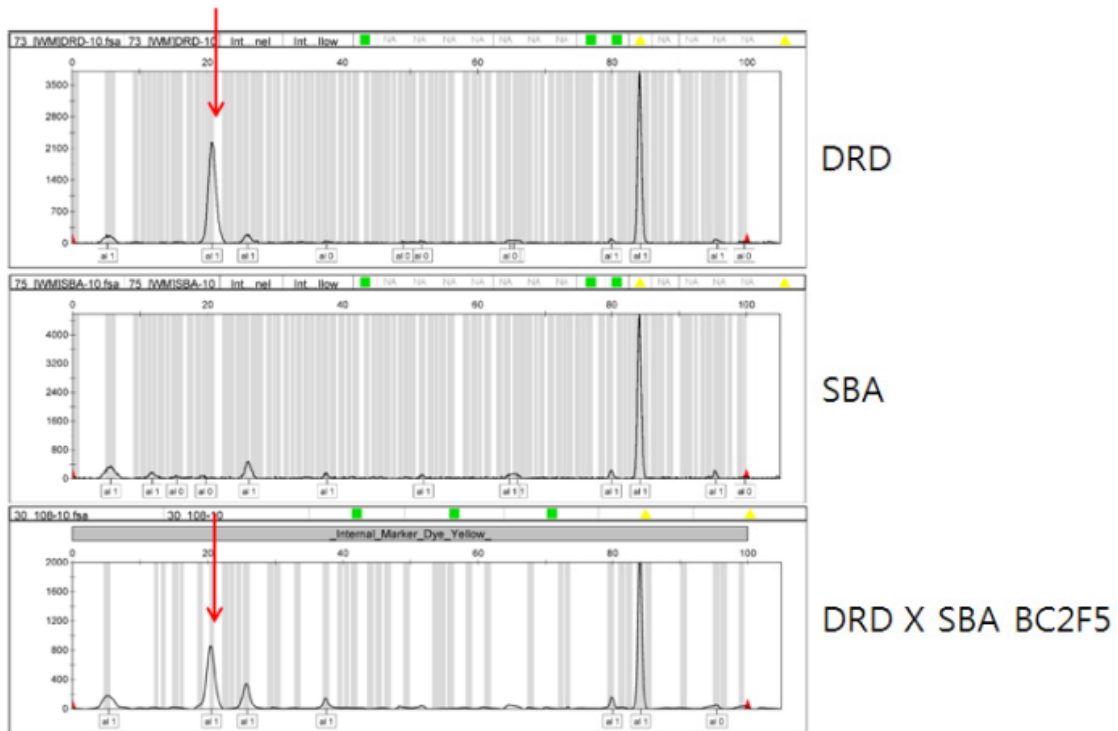


그림 7. 한 SRAP primer 마커 검정 결과를 보여주는 sequencing gel 이미지. SBA를 반복친으로 한 여교잡 계통과 SBA간 다형성인 마커 FAM10-100 (붉은색 화살표).

FAM #1(400)-SBA,108

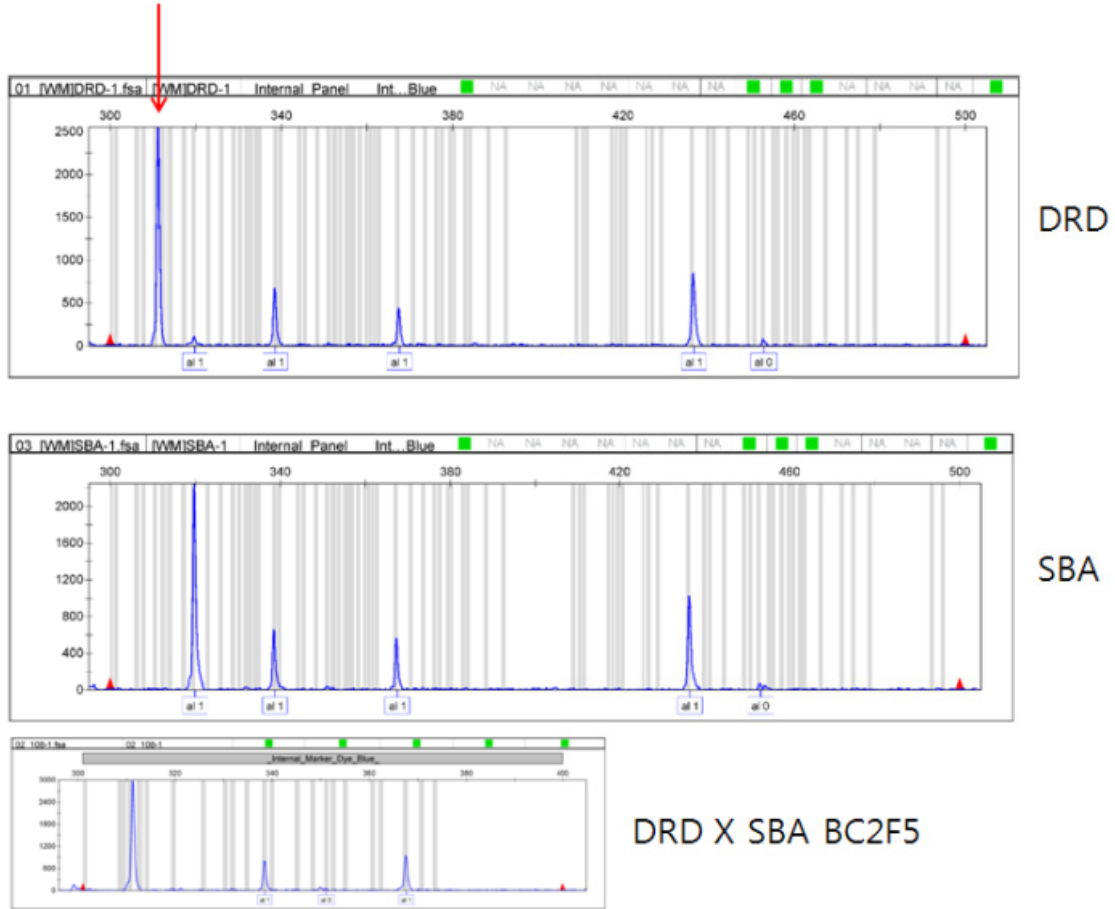


그림 8. 한 AFLP primer combination 마커 검정 결과를 보여주는 sequencing gel 이미지. SBA를 반복친으로 한 여교잡 계통과 SBA간 다형성인 마커 FAM1-400 (붉은색 화살표).

다. 3차년도 연관마커 분석

(1) NIL계통을 이용한 스크리닝

(가) 1차 스크린

RAPD primer 200개(A01~J20)을 이용하여 스크린 한 결과 3개의 primer에서 다형성을 볼 수 있었다. 표 16의 DNA를 이용하여 나온 3개 primer에 대한 결과는 그림 9와 같다.

표 16. 마커분석에 이용된 NIL 계통

번호	계통명	세대	비고	라이코핀 함량
101	DRD	고정계통	고함량라이코핀Source	최고 높음
102	SBB	고정계통		낮음
104	DRDSBB3	BC3F4	SBB를4번Backcross한NIL	높음
107	SBA	고정계통		낮음
108	DRDsbaBC2F5	BC2F5	SBA를3번backcross한F5	높음
109	45nc	고정계통		낮음

번호	계통명	세대	비고	라이코핀 함량
110	DRD45ncBC3F3	BC3F3	45NC를4번BC한F3	높음
111	NT(2X)	고정계통		낮음
112	DRDNT(2X)BC2F5	BC2F5	NT(2X)를3번BC한F5	함량 높음

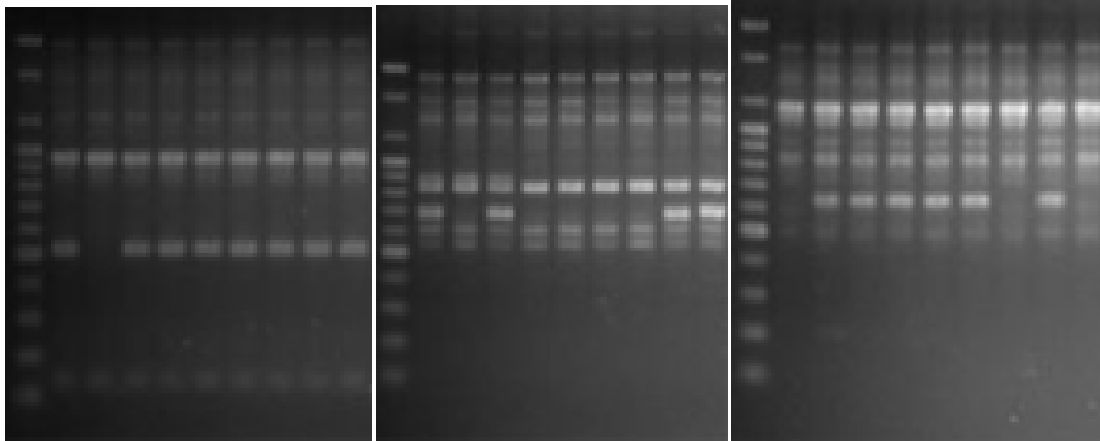


그림 9. (a)A16 (b)H08 (c)I18

그림 9에서의 (a) A16 primer를 이용하여 증폭한 결과로 DRD와 SBB간 다형성을 보이는 것을 관찰할 수 있다. (b)에서는 H08 primer를 사용하였으며 역시 DRD와 SBB간 다형성을 보였다. (c)은 I18 primer로 증폭하였고 DRD와 45NC, NT 두 가지 계통에서 다형성을 볼 수 있었다.

RAPD로 확인한 마커를 CAPS마커로 전환하기 위해 다형성을 보이는 밴드들에 대한 염기서열 분석을 하였다. 그림 10의 (a)는 A16의 마커에 대한 염기서열이다. DRD와 SBB간 차이를 보이는 SNP 중 MseI의 제한효소가 인식하는 부위를 이용하여 증폭 후 제한효소 처리를 하였다. DRD와 SBB간 밴드의 차이를 확인할 수 있었다(b). 그림 11의 (a)는 H08의 마커에 대한 염기서열이고, 차이가 나는 SNP 부분에 해당하는 제한효소로 처리 했을 경우(b)차이가 나지 않는 것을 볼 수 있다. 이는 염기서열에 대한 재확인이 필요할 것이다. 그림 12는 I18 마커의 염기서열인데 DRD와 NT, 45NC간 차이가 없음을 볼 수 있다.

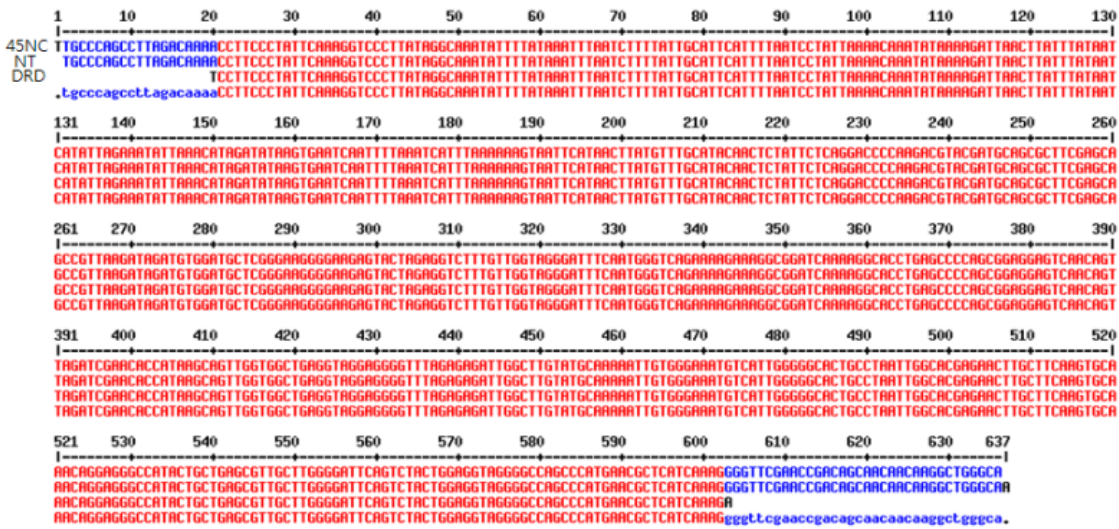


그림 12. 염기서열 분석

(나) 3차 스크린

RAPD UBC primer 384개(UBC001~UBC384)을 이용하여 스크린 한 결과 7개의 primer에서 형성을 볼 수 있었다. 표 17의 DNA를 이용하여 나온 마커는 그림 13, 14, 15와 같다.

표 17. 마커분석에 이용된 NIL 계통

번호	계통명	세대	비고	라이코핀 함량
101	DRD	고정계통	고함량라이코핀Source	최고 높음
102	SBB	고정계통		낮음
104	DRDSBB3	BC3F4	SBB를4번Backcross한NIL	높음
109	45nc	고정계통		낮음
110	DRD45ncBC3F3	BC3F3	45NC를4번BC한F3	높음
111	NT(2X)	고정계통		낮음
112	DRDNT(2X)BC2F5	BC2F5	NT(2X)를3번BC한F5	높음
	NH100-59,61,62			높음

그림 13은 DRD와 SBB간 다형성을 보이는 마커이고 그림 14는 DRD와 45NC, NT 두 계통에서 다형성을 보이는 마커이며, 그림 15는 DRD와 NT간 다형성을 보이는 마커이다. 이러한 마커를 이용하여 처음 스크린 한 것처럼 마커의 염기서열 분석과 CAPS마커로의 전환에 대한 추가 실험이 이루어져야 할 것으로 보인다.

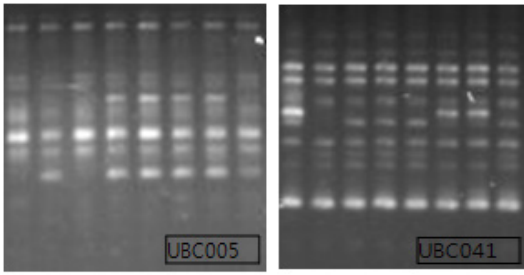


그림 13. (a) 다형성을 보이는 primer

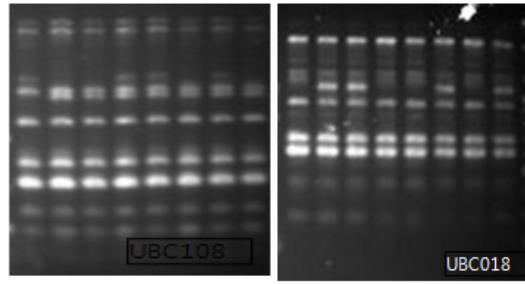


그림 13. (c) 다형성을 보이는 primer.

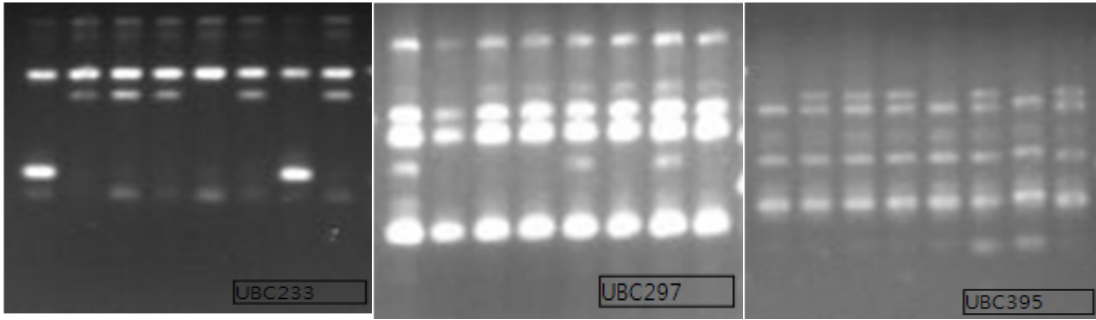


그림 13. (b) 다형성을 보이는 primer

(2) F2집단을 이용한 스크리닝

(가) 1차 스크린

RAPD primer 1000개(AA01~BH20)을 이용하여 스크린 하였다.

표 18. 분석에 사용된 F2 Bulk와 라이코핀 함량

번호	개체번호	세대	계통명	구분	라이코핀 함량	비고	비고2	
NH10045	514-004	BC4F2	DRDSBB3 BC4F2	Segregant (high:medium:low = 1:2:1)	187.78	Bulk (High)	우성 호모	BSA 그룹 H
NH10059	514-018	BC4F2	DRDSBB3 BC4F2	Segregant (high:medium:low =1:2:1)	169.84	Bulk (High)	우성 호모	
NH10061	514-020	BC4F2	DRDSBB3 BC4F2	Segregant (high:medium:low =1:2:1)	168.59	Bulk (High)	우성 호모	
NH10062	514-021	BC4F2	DRDSBB3 BC4F2	Segregant (high:medium:low =1:2:1)	179.86	Bulk (High)	우성 호모	
NH10048	514-007	BC4F2	DRDSBB3 BC4F2	Segregant (high:medium:low =1:2:1)	45.49	Bulk (Low)	열성 호모	BSA 그룹 L
NH10049	514-008	BC4F2	DRDSBB3 BC4F2	Segregant (high:medium:low =1:2:1)	39.00	Bulk (Low)	열성 호모	

번호	개체번호	세대	계통명	구분	라이코핀 함량	비고	비고2
NH10050	514-009	BC4F2	DRDSBB3 BC4F2	Segregant (high:medium:low =1:2:1)	58.96	Bulk (Low)	열성 호모
NH10057	514-016	BC4F2	DRDSBB3 BC4F2	Segregant (high:medium:low =1:2:1)	55.79	Bulk (Low)	열성 호모

표 18의 DNA는 F2집단을 이용하여 이 집단의 모본은 DRD, 부분은 SBB이다. BSA 그룹을 나누어 실험하였는데, 라이코핀 함량이 높은 4개와 낮은 4개를 묶어 각각 H, L 두 그룹으로 나누어 이를 2반복 실험하였다. 다형성이 보이는 primer를 골라 재확인 하였으나 재현성을 갖는 primer는 AP16이었다.

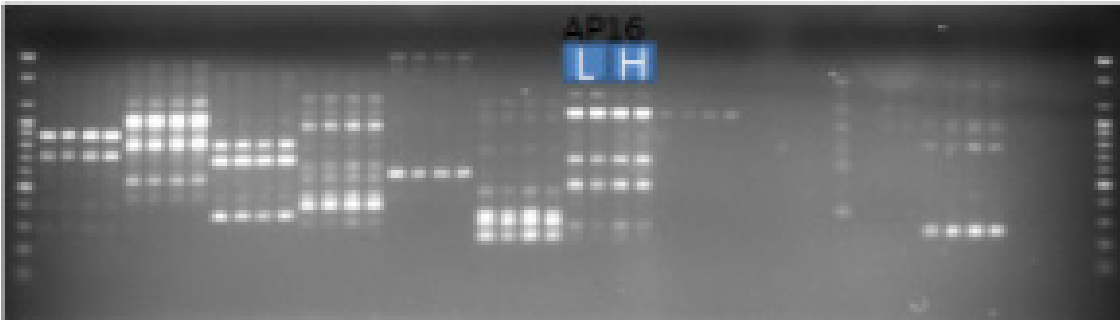


그림14. 4개의 bulk집단에 대한 마커분석

H, L 그룹으로 묶었던 DNA들을 풀어서 각각 AP16의 primer로 테스트 해 보았다. 그 결과 AP16 primer는 H와 L그룹을 나누는 마커로 적합하지는 않았다.

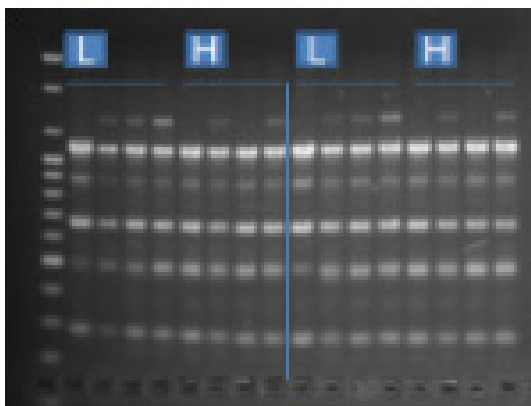


그림 15. primer AP16을 이용한 F2 개체 분석

(나) 마커 재 테스트

앞의 NIL계통으로 찾은 DRD와 SBB간 다형성을 보이는 마커 A16과 H08을 이용하여 F2 개체 샘플을 테스트 해 보았다. 결과를 보면 앞의 결과와 같이 DRD와 SBB간의 다형성은 보이지만

BSA그룹의 라이코핀 함량 결과와 일치하지 않음을 볼 수 있다.

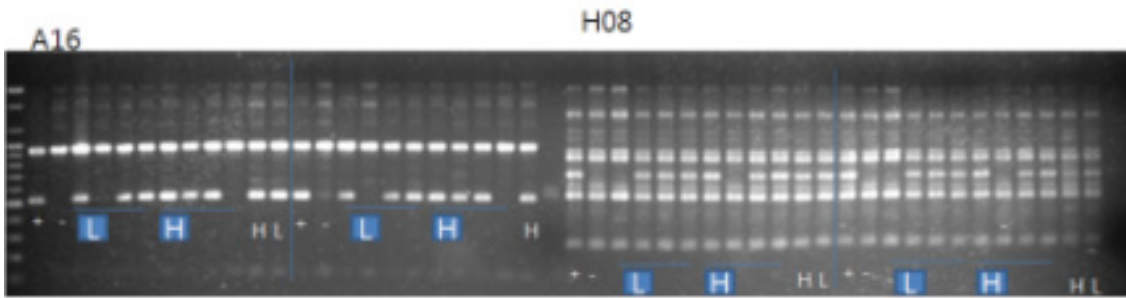


그림 16. F2 집단에 대한 마커분석

(+ : DRD, - : SBB, H : BSA의 H그룹, L : BSA의 L그룹).

(3). DRD × 45NC 조합의 BC4F2(78개체)집단을 이용한 스크리닝

총 3차에 걸쳐 RAPD-*operon* primer 1032개를 분석하였지만, 연관마커는 찾아지지 않았다.

(가) I18 primer로 전체 테스트

DRD × 45NC 조합으로 앞에서 NT에 대한 다형성을 보였던 마커 I18을 이용하여 전체 테스트하였다. 그림 17에서 보는 것과 같이 control 샘플과 같은 밴드의 유무가 확인되었다.

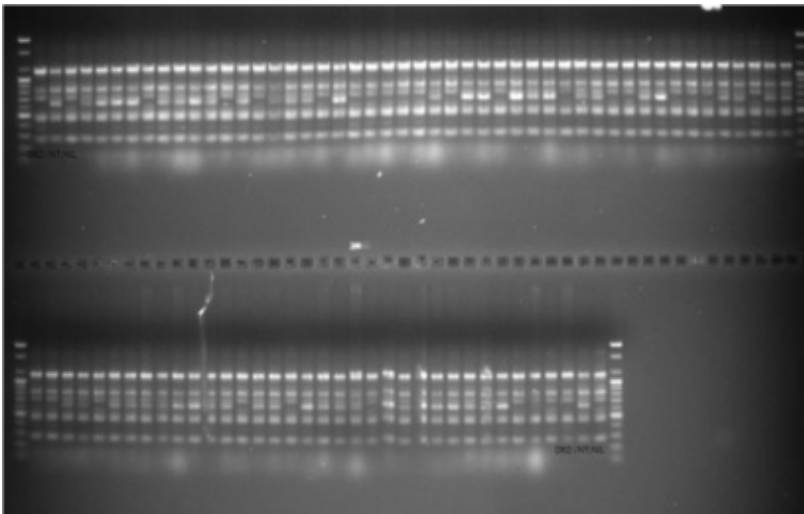


그림 17. primer I18을 이용한 F2 분석

(나) 1차 스크린

표 19. F2 bulk집단과 라이코핀 함량

1차		Lycopene 함량	sample	I18	집단	group
DN11067	1501-70	40.4	70	H	L-1	L
DN11047	1501-50	43.4	50	H		
DN11040	1501-43	46.9	43	H		
DN11046	1501-49	47.2	49	H		
DN11060	1501-63	41.3	63	L	L-2	
DN11030	1501-32	43.3	32	L		
DN11004	1501-04	44.4	4	L		
DN11053	1501-56	46.5	56	L		
DN11062	1501-65	73.4	65	H	H-1	H
DN11024	1501-26	74	26	H		
DN11034	1501-37	74	37	H		
DN11035	1501-38	82.9	38	H		
DN11054	1501-57	73.6	57	L	H-2	
DN11074	1501-77	76.9	77	L		
DN11051	1501-54	86.4	54	L		
DN11071	1501-74	90.2	74	L		

라이코핀 함량을 분석하였는데, I18의 결과와는 일치하지 않았다. 이 값을 기준으로 라이코핀 함량이 높은 것 4개씩 묶어 2집단, 낮은 것 4개씩 묶어 집단을 만들었다. 단 집단끼리는 I18로 분석하여 나뉘는 그룹으로 집단을 나누었다(표 19).

4개의 집단으로 A01 ~ H04(144개)의 primer를 테스트 하였다. 다형성을 보이는 밴드는 없었다(그림 18.참조).

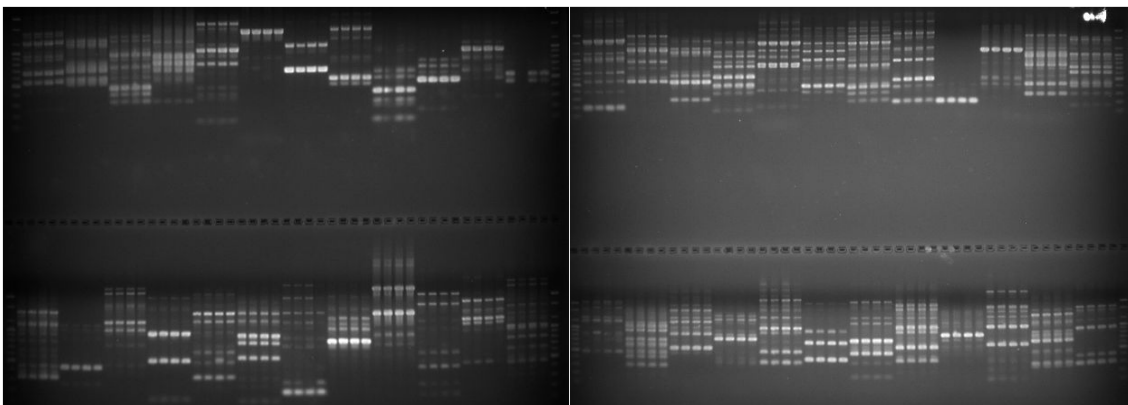


그림 18. F2 bulk 집단에 대한 마커분석(1차)

(다) 2차 스크린

라이코핀 값을 기준으로 함량이 높은 순서대로 4개씩 묶어 2집단, 낮은 순서대로 4개씩 묶어 2집단으로 다시 H05 ~ O08(144개)의 primer를 테스트 하였지만 역시 다형성을 보이는 밴드는 없었다(표 20, 그림 19 참조).

표 20. F2집단에 대한 bulk와 라이코펜 함량

2차	개체번호	Lycopene 함량	sample	집단	group
DN11040	1501-43	46.9	43	L-1	L
DN11046	1501-49	47.2	49		
DN11004	1501-04	44.4	4		
DN11053	1501-56	46.5	56		
DN11067	1501-70	40.4	70	L-2	
DN11047	1501-50	43.4	50		
DN11060	1501-63	41.3	63		
DN11030	1501-32	43.3	32	H-1	
DN11035	1501-38	82.9	38		
DN11051	1501-54	86.4	54		
DN11071	1501-74	90.2	74		
DN11024	1501-26	74.0	26	H-2	
DN11034	1501-37	74.0	37		
DN11074	1501-77	76.9	77		

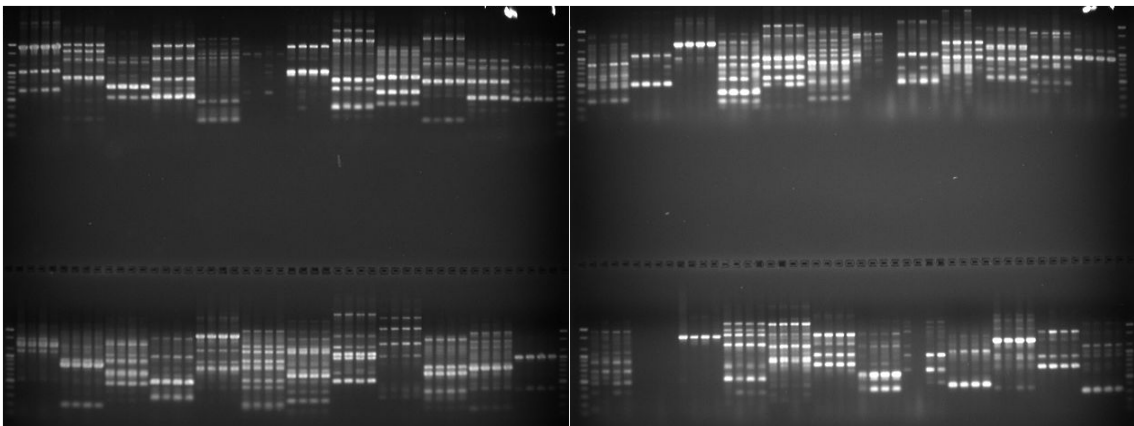


그림 19. F2 bulk집단에 대한 마커분석(2차)

(라) 3차 스크린

라이코펜 값을 기준으로 함량이 높은 순서대로 2개씩 묶어 2집단, 낮은 순서대로 2개씩 묶어 2집단으로 다시 O09 ~ AZ12(744개)의 primer를 테스트 하였지만 역시 다형성을 보이는 밴드는 없었다(표 21, 그림 20 참조).

표 21. F2 bulk집단과 라이코핀 함량

3차	개체번호	Lycopene 함량	sample	집단	group
DN11067	1501-70	40.4	70	L1	L
DN11060	1501-63	41.3	63		
DN11047	1501-50	43.4	50	L2	
DN11030	1501-32	43.3	32		
DN11035	1501-38	82.9	38	H1	H
DN11074	1501-77	76.9	77		
DN11051	1501-54	86.4	54	H2	
DN11071	1501-74	90.2	74		

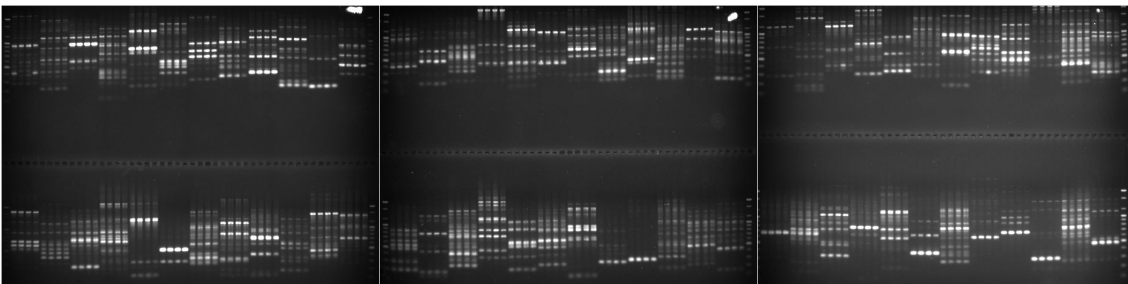


그림 20. F2 bulk집단에 대한 마커분석(3차)

라. 4차년도 연관마커 분석

(1) 라이코핀 합성과 분해관련 유전자 탐색

최근 보고된 Guo et al (2011)의 연구결과에 의하면 phytoene synthase(PSY) 와 lycopene beta cyclase(LCYB) 유전자가 수박 라이코핀 축적과 밀접하게 관련되어 있다고 한다. 수박 과육이 붉은색으로 성숙함에 따라서, 라이코핀 함량이 급격히 증가하고, 이와 동시에 PSY 유전자의 발현은 급격히 증가하며, 반대로 라이코핀 분해에 관련된 LCYB 유전자의 발현은 급격히 감소하였다(그림 21). 따라서 라이코핀 고함량 축적을 위해서는 PSY 유전자의 발현 증가와 LCYB 유전자의 발현 감소가 중요하다는 것을 알 수 있었다(그림 22). 그러므로 본 연구에서는 PSY와 LCYB 유전자를 라이코핀 수박 판별용 분자 마커 개발을 위한 후보 유전자로 선정하였다.

(A)

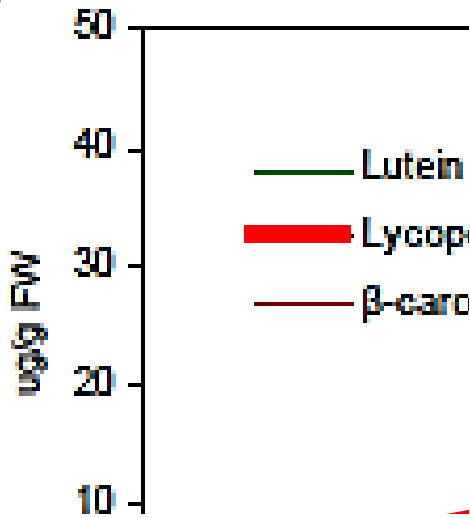


그림 21. 수박 과육 성숙에 따른 라이코펜 함량(A) 및 생합성 유전자 발현 변화(B).

(A) 과육색이 붉은색으로 성숙하면서 라이코펜 함량이 급격히 증가함.

(B) carotenoid 생합성 유전자 중 phytoene synthase(PSY)1의 발현은 급격히 증가하지만, 반대로 lycopene beta cyclase (LCYB)의 발현은 급격히 감소함

(Guo et al., 2011).

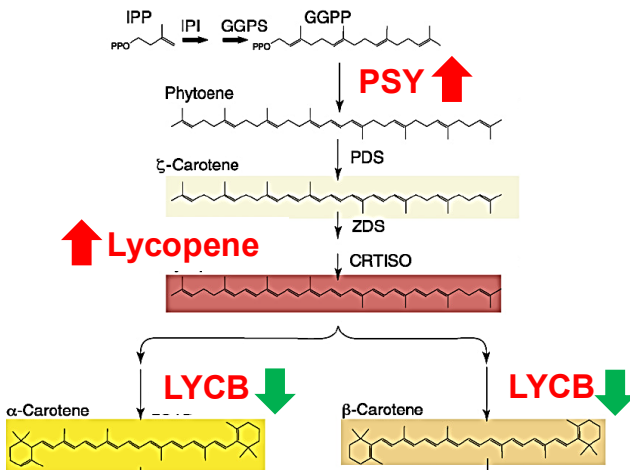


그림 22. 수박 lycopene 축적에 중요한 carotenoid 생합성 유전자인 PSY 및 LYCB 발현 변화 모델.

PSY: phytoene synthase, LYCB: lycopene beta cyclase.

(2) 수박 PSY 및 LCYB 유전자 발굴 및 PCR primer 설계

박과 genome DB(<http://www.icugi.org/>)분석으로 수박 PSY 유전자 3종(Gene ID: Cla003169, Cla005425, Cla009122)의 genomic DNA 서열을 발굴했으며 (그림 23), 이 중 Cla009122는 Guo et al(2011) 연구에서 분석된 PSY 유전자(WMU38667)와 동일한 유전자였다. 동일한 분석으로 수박 LCYB 유전자 2종(Gene ID: Cla005010, Cla016840)의 genomic DNA 서열을 발굴했으며 (그림 24), 이 중 Cla005010은 Guo et al(2011) 연구에서 분석된 LCYB 유전자(WMU41454)와 동일한 유전자였다. 찾아진 총 5종의 서열에 대해서 약 1kb마다 PCR primer를 중첩되도록 설계하여, 총 21쌍의 primer set를 만들었다 (표 22, 표 23). 현재 이 primer set을 이용하여 고품량 수박과 일반 수박 계통으로부터 추출한 genomic DNA를 주형으로 genomic-PCR 분석을 수행하였다.

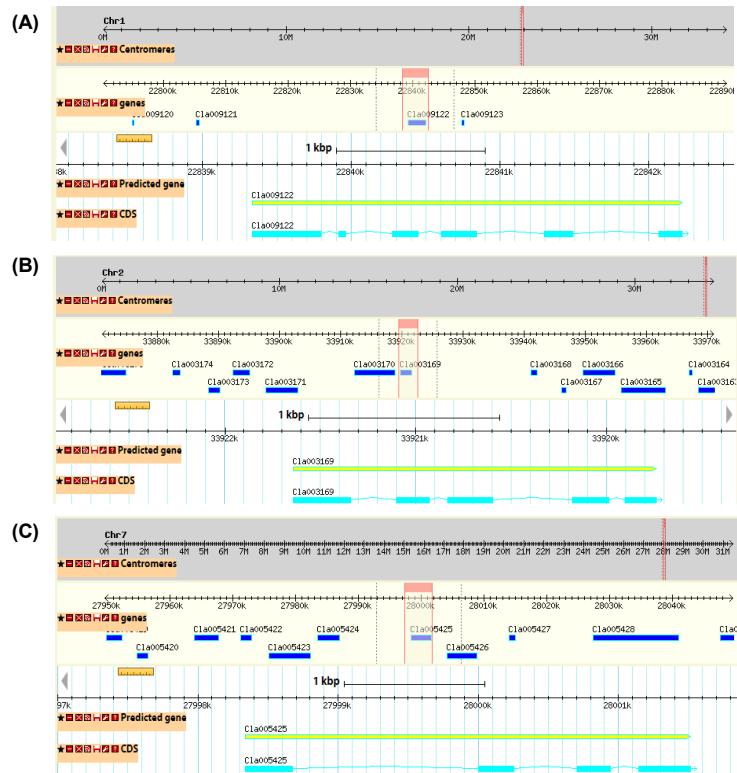


그림 23. 수박 phytoene synthase (PSY) 유전자 발굴. 수박 PSY 유전자 3종의 genomic DNA 서열을 박과 genome DB(<http://www.icugi.org/>)로부터 추출함. (A) Gene ID: Cla009122(WMU38667), (B) Cla003169, (C) Cla005425.



그림 24. 수박 lycopene beta cyclase(LCYB) 유전자 발굴. 수박 LCYB 유전자 2 종의 genomic DNA 서열을 박과 genome DB(<http://www.icugi.org/>)로부터 추출함. (A) Gene ID: Cla005010(WMU41454), (B) Cla016840.

표 22. 수박 phytoene synthase 유전자 분석용 primers

Primer name	nucleotide sequence (5' to 3)
WM_Cla003169(PSY)-tF1	AGGGATTGAGTGTTGAAAAGAAGACACAAA
WM_Cla003169(PSY)-tR1	CCCACCAACGATAGATCGAACTTTTGCTAT
WM_Cla003169(PSY)-tF2	ACCCATGAAAGTGAAGAGTTTTGGTCA
WM_Cla003169(PSY)-tR2	ACCCAACACCTCCCAAGAGCTTTC
WM_Cla003169(PSY)-tF3	CCCCTCCTCCCTATGCTTTATTGGGT
WM_Cla003169(PSY)-tR3	GTATGACCGCAATCTTTTAGCTGACGAGT
WM_Cla005425(PSY)-tF1	CTACTATTCTAGTTC AAGAAGGGAGGCCA
WM_Cla005425(PSY)-tR1	TGGTTTGAACCCA ACTTCAGCCATT
WM_Cla005425(PSY)-tF2	TTGGTTGCCAAGAATATAGAATTGGGATGT
WM_Cla005425(PSY)-tR2	TTCCGAAATCTCTCTATAAAGGAGGCCA
WM_Cla005425(PSY)-tF3	TCAGTAGTGGTATGTCCTAAAGGTTCTTGA
WM_Cla005425(PSY)-tR3	GGCAGCCTAAAGTTCTCATATCGCA
WM_Cla005425(PSY)-tF4	ACATTCAGGTAAACTTGACTTAGGGTCTGT
WM_Cla005425(PSY)-tR4	CGCATAGCCCTGCTTGTGCCA
WM_Cla005425(PSY)-tF5	TGGCAGTGCATGAATTTGTTTGGTC
WM_Cla005425(PSY)-tR5	GGGCCACCATAGCTCTCCA
WM_Cla009122(PSY)-tF1	TGTCGGGATCAAGCAACCACACA
WM_Cla009122(PSY)-tR1	TGCTCATCAGATTCGCCGCTCG
WM_Cla009122(PSY)-tF2	ACGTCGAACTTTCCCATCGAGC
WM_Cla009122(PSY)-tR2	CTTGCTCCCATCTGTCCAATGCAG
WM_Cla009122(PSY)-tF3	TGTTGATGGGCCAAATGCTTCACA
WM_Cla009122(PSY)-tR3	AGCACTTTACACACCCACCAAACA
WM_Cla009122(PSY)-tF4	TGATGAATGGAAAGATGCAAGATGTGATGT
WM_Cla009122(PSY)-tR4	AGGGCCAAGGAGAGACCTTGC
WM_Cla009122(PSY)-tF5	TGGCCGGTAATTTCCCTTTTCCTTT
WM_Cla009122(PSY)-tR5	TGAAAAGTCCC ACTAAGCAAAGTTATGT

표 23. 수박 lycopene beta cyclase 유전자 분석용 primers

Primer name	nucleotide sequence (5' to 3)
WM_Cla005011(LCYB)-tF1	AGAGGTAACTCGTGGACCTCGTC
WM_Cla005011(LCYB)-tR1	ACCACTCACTTTTTCGAAACCCCA
WM_Cla005011(LCYB)-tF2	CCCGTCCTCAGGTTTCGCCTC
WM_Cla005011(LCYB)-tR2	AGGCATCGAGAGACGCCAGTG
WM_Cla005011(LCYB)-tF3	TCTTGCGGTCGTGGGAGGC
WM_Cla005011(LCYB)-tR3	AGGGTGCACCATCCCTGCTGT
WM_Cla005011(LCYB)-tF4	GGGTGGACCGCTGCCAGTTC
WM_Cla005011(LCYB)-tR4	TGTGCTGACAGATAACTTTTGAAGCACT
WM_Cla017416(LCYB)-tF1	ACCGAACAAACAACATCGACATAACACA
WM_Cla017416(LCYB)-tR1	AATGAGGGAAATGTGTGTAGACAAAGGGG
WM_Cla017416(LCYB)-tF2	TGTGTCACTTGTAGATTCCCCCTTTGT
WM_Cla017416(LCYB)-tR2	TTCCCTGCTCACCTGTGTGAAAGCAA
WM_Cla017416(LCYB)-tF3	TCACATGCGCTTAAATGTTAAGATCCGA
WM_Cla017416(LCYB)-tR3	ATCATCTCCCGCCCCACC
WM_Cla017416(LCYB)-tF4	ACTGCGGCTTCAAATCGCCC
WM_Cla017416(LCYB)-tR4	TCCGCAACCCAAACACGTTAATCT

(3) 수박 PSY 및 LCYB 유전자관련 PCR 분석
 2 PSY, 3 LCYB, and 1 CRTISO genes에 대한 genomic DNA PCR 분석결과 표 24에 나타난 저함량 및 고함량 NILs간에 크기가 다른 밴드는 발견되지 않았다. 또한 LCYB-derived CAPS marker 에서도 차이가 나는 밴드가 발견되지 않았다. 따라서 라이코핀 생합성관련 유전자의 차이가 아니라 그 앞에 위치한 promoter부위의 차이가 아닐까 추측을 하게 되었다.

표 24. PCR 분석에 사용된 NIL의 특성

번호	계통명	세대	특성
6201	DRD45NC	BC3F6	45NC로 4번 BC한 NIL
6202	45NC	Line	고정계통으로 라이코핀 함량이 낮음
6203	DRDSBA(BC3)	BC3F4	SBA로 4번 BC한 NIL
6204	SBA	Line	고정계통으로 라이코핀 함량이 낮음

(4) 현재 진행상황 및 향후 계획

(가) 라이코핀 함량 NIL 계통의 resequencing을 통한 형질연관 genomic region 예측
 : 현재 라이코핀 연관마커개발을 위해 라이코핀 함량 NIL계통인 TSDRD, SBA, SBADR, NC45, NC45DRD에 대한 NGS 기반 resequencing을 수행하고 있으며 향후 약 3개월내에 염기서열이 완성되면 분석을 통해 아래와 같은 연구를 진행할 계획이다.

- 수박 Reference map 기반으로 분석된 염기서열의 맵핑
- 결과 분석 및 NIL 계통에 interogressed 된 SNP 탐색
- SNP에 대한 기능 유전자 예측
- RIL 집단을 이용한 resequencing으로 탐색된 SNP의 형질과의 연관 재분석

5. 고함량 라이코핀 품종개발

가. 2차년도 고함량 라이코핀 조합의 성능 검정

(1) 경종개요

라이코핀 함량이 상이한 조합의 성능 검정은 총 3회에 걸쳐 수행되었다(표 25). 저온기의 특성검정을 위해 함안군 대산면의 농가포장을 임대하여 34품종을 공시하여 수행하였으며, 2009년 11월 26일에 파종하여 참박대목 ‘동장군’에 접목하여 1월 12일 정식하였다. 수 회의 농가방문을 통해 초형관련 특성, 과형관련 특성 등을 조사하였고, 5월 3일에 당도, 과육색, 식미 등의 특성을 조사하였다. 적기1 특성검정시험은 음성군 맹동면의 농가포장에서 58품종을 공시하여 수행하였으며, 2010년 2월 22일에 파종하여 참박대목 ‘블로장생’에 접목하여 3월 29일 정식하였으며 7월 5일 수확 조사하였다. 적기2 특성 검정 시험은 안성시 공도읍에 위치한 NH종묘센터의 시험포장에서 17품종을 공시하여 수행하였으며, 2010년 3월 8일에 파종하여 참박대목 ‘블로장생’에 접목하여 4월 9일 정식하였고, 7월 2일 수확 조사하였다. 일부 대비종과 라이코핀 함량이 높을 것으로 추정/판단된 조합에 대하여는 절단과육의 중간부분을 채취하여 냉동 보관 후 HPLC를 이용하여 라이코핀 함량을 분석하였다.

표 25. 고함량 라이코핀 조합의 특성검정 시험 개요

구분	과종일	정식일	조사일	시험지역	공시품종	비고
저온기	09. 11. 26	10. 1. 12	10. 5. 3	함안	34품종	농가실증시험
적기1	10. 2. 22	10. 3. 29	10. 7. 5	음성	58품종	농가실증시험
적기2	10. 3. 8	10. 4. 9	10. 7. 2	안성	17품종	

(2) 저온기 조합성능검정

저온기의 라이코핀 관련 조합의 특성 및 라이코핀 함량은 표 25에 정리되어 있다. 표 2에 나타난 바와 같이 품종에 따라 라이코핀 함량이 최고 149.6 μ g/mg에서 최저 46.3 μ g/mg로 품종별로 큰 차이를 보였다. 품종1은 저온기에 가장 많이 재배되고 있는 ‘스피드꿀’로서 육색은 도홍색이며, 라이코핀 함량 조사결과 59.9 μ g/mg의 함량을 보여주었으며, 가장 높은 조합은 30번 조합으로 적색계통과 극적색계통 간의 단타원형 조합으로 149.6 μ g/mg를 보여주어 대비종의 함량과 비교하여 150% 함량이 증대되었다. 이 조합은 적기1 시험의 253번, 적기2 시험의 609번 조합과 동일한 조합으로 적기1 시험에서는 131.2 μ g/mg, 적기2 시험에서는 149.6 μ g/mg으로 재배시기에 관계없이 매우 높은 수준의 라이코핀 함량을 보여주었다(그림 26). 29번 조합은 과육색이 도홍과 적육색 계통 간의 단타원형 조합으로 라이코핀 함량이 128.8 μ g/mg를 보여주었다. 31번 조합은 라이코핀 함량이 119.5 μ g/mg로 대비종에 비하여 99%의 증가가 나타났으며, 역시 유사한 과육색 특성을 보이는 계통 간의 조합인 33번 조합은 89.2 μ g/mg로 대비종보다 49% 높은 라이코핀 함량을 보여주었다(그림 25). 33번 조합의 경우 적기1 시험의 255번 조합, 적기2 시험의 611번 조합과 동일한 조합으로 적기1 시험에서는 166.8 μ g/mg로 저온기와 비교하여 87% 높게 나타났으며, 적기2 시험에서는 123.9 μ g/mg로 40% 높게 나타나 재배시기에 따라 라이코핀 함량의 변화가 관찰되었지만, 대비종에 비해서는 계속 높게 나타났다(그림 25). 32번 품종은 도홍 × 적색 계통 간의 조합으로 라이코핀 함량이 대비종보다 높게 나타날 것으로 예상하였으나, 분석결과 59.1 μ g/mg로 대비종과 매우 유사한 수준의 함량을 보여주었다. 이 조합을 적기2 시험에 공시하였을 때(604번 조합) 134.4 μ g/mg함량을 보여주어 재배시기에 따라서 라이코핀 함량의 차이가 매우 크게 나타났다. 34번 품종도 라이코핀 함량이 높을 것으로 예상되었는데, 대비종보다 낮은 수준으로 나타났고, 적기1 시험에서는(250번) 81.1 μ g/mg, 적기2 시험(603)에서는 116.5 μ g/mg로 적기시험에서 라이코핀 함량이 높게 나타났으나, 대비종보다 함량의 증가가 예상만큼 많지는 않았다. 저온기에 라이코핀 함량이 높게 나타난 조합의 양친구성을 보면 극적색을 보이는 계통이 활용된 조합에서 전반적으로 높게 나타나 라이코핀 함량과 과육색 간에는 상당한 연관이 있다고 판단된다. 본 시험에서 과육색이 연한 품종(스피드꿀)에서는 라이코핀 함량이 낮게 나타났고, 과육색이 진한 조합들(29, 30, 31번 조합)에서는 라이코핀 함량이 높게 나타나, 저온기에서도 육색이 진한 고함량 라이코핀 조합의 특성이 안정적으로 발현되는 것이 확인되었다(그림 25). 전반적으로 저온기시험에서는 과육색의 강도가 적기보다 연하게 나타나는데, 라이코핀 함량도 적기시험보다 낮게 나타나 연관이 있는 것으로 판단된다.

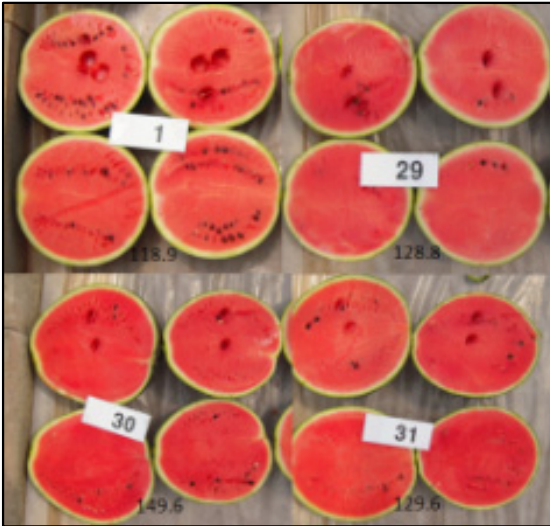


그림 25. 저온기 시험에서 확인된 고함량 라이코펜(29, 30, 31) 상위 3조합과 대비종(1)의 과육색

(3) 적기1 조합성능 검정

충북 음성군 맹동면의 수박재배 농가에서 수행된 적기1 시험의 주요 조합 특성과 라이코펜 함량은 표 27에 정리되어 있다. 이 시험에서는 대비종으로 공시된 삼복꿀수박(문산토)과 흑미(삼성)을 포함하여 총 58 품종의 조합이 공시되었다. 대비종인 삼복꿀의 라이코펜 함량은 $73.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 이고 흑미는 $81.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 로 유사한 함량을 보여주고 있고, 현재 우리나라에서 재배되고 있는 일반적인 품종의 라이코펜 함량이 대략 이 수준일 것으로 판단된다. 이 시험에서 가장 높은 라이코펜 함량을 보여준 조합은 254번 조합으로써 $174.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ 의 함량으로 대비종인 삼복꿀의 $73.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 와 비교하여 238% 높은 함량을 보여주었다. 255번 조합이 라이코펜 함량 $166.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ 로 두 번째로 높은 라이코펜 함량을 보여주었는데, 대비종에 비하여 228% 높았으며 저온기에 재배하였을 때(33번 조합)의 $89.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 보다 약 2배 정도 높게 라이코펜 함량이 증가하여 재배 시기에 따라 변화가 큰 품종이었다. 253번 조합도 양친 중의 한쪽 친이 극적육색을 보이는 계통이 이용되었는데, 라이코펜 함량이 $131.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 로 대비종보다 179%의 라이코펜 함량이 나타났다.

표 26. 라이코펜 조합 특성 및 라이코펜 함량(저온기)

품종	조합구성	과형	과피색	과중(kg)	Brix(%)	과형균일 ^Z	육색 ^Y	숙기 ^X	저장성 ^W	라이코펜함량($\mu\text{g}/\text{mg}$)	라이코펜함량 대비
1	스피드꿀	단타원형	호피	4.6	10.8	7	5	6	7	59.9	100%
29	도홍 × 적	원형	호피	4.0	11.9	7	6	6	7	128.8	215%
30	적 × 극적	단타원형	크림슨	4.9	11.1	4	9	7	7	149.6	250%
31	적 × 극적	단타원형	호피	4.9	11.1	3	9	7	4	119.5	199%
32	도홍 × 적	단타원형	후피	4.4	10.8	7	8	5	7	59.1	99%
33	적 × 극적	단타원형	후피	4.5	12.5	7	8	6	7	89.2	149%
34	도홍 × 적	단타원형	호피	3.9	11.2	5	6	6	7	46.3	77%

Z: 숫자가 높을수록 균일도 우수, Y: 숫자가 높을수록 진한 적육색, X: 숫자가 높을수록 숙기가 빠름, W: 숫자가 높을수록 저장성이 우수

표 27. 라이코펜 조합 특성 및 라이코펜 함량(적기1)

품종	조합구성	과형	과피색	과중(kg)	Brix(%)	과형균일	육색 ^Y	숙기 ^X	저장성 ^W	라이코펜함량($\mu\text{g}/\text{mg}$)	라이코펜함량 대비
201	삼복꿀	단타원형	호피	11.3	10.9	5	5	5	7	73.2	100%
243	후미	단타원형	후피	11.0	10.7	3	5	6	5	81.2	111%
247	도홍 × 적	원형	후피	11.4	11.8	5	7	6	7	103.2	141%
249	도홍 × 적	단타원형	후피	9.9	11.4	6	7	7	5	80.8	110%
250	도홍 × 적	단타원형	호피	10.1	10.6	5	7	7	4	81.1	111%
251	극적 × 적	단타원형	후피	9.7	11.3	4	7	7	4	124.5	170%
252	도홍 × 적	단타원형	후피	9.0	10.4	5	8	7	4	109.5	150%
253	적 × 극적	단타원형	크림슨	9.9	10.7	7	8	7	6	131.2	179%
254	적 × 극적	단타원형	호피	11.0	11.1	4	8	7	6	174.3	238%
255	적 × 극적	단타원형	후피	11.3	11.1	7	7	5	7	166.8	228%

Z: 숫자가 높을수록 균일도 우수, Y: 숫자가 높을수록 진한 적육색, X: 숫자가 높을수록 숙기가 빠름, W: 숫자가 높을수록 저장성이 우수

재배지역이 다른 적기2 시험에서(609번 조합)도 149.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 재배지역에 관계없이 매우 높은 수준을 보여줌을 알 수 있다.



그림 26. 적기1 시험에서 확인된 고함량 라이코핀 상위 3조합(253, 254, 255)과 대비종(201)의 과육색



그림 27. 적기2시험에서 확인된 고함량 라이코핀 상위 3조합(605, 609, 610)과 대비종(601)의 과육색

(4) 적기2 조합성능 검정

적기2 시험은 안성시 공도읍의 NH종묘센터의 시험포장에서 수행되었는데, 대비종으로 꿀나라(NH종묘센터)와 흑미(삼성종묘)를 포함하여 총 17조합이 공시되었고, 주요 특성과 라이코핀 함량은 표 27에 나타나 있다. 대비종으로 이용된 꿀나라수박의 라이코핀 함량은 82.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났으며, 이는 적기1 시험의 대비종인 삼복꿀 함량 73.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 흑미의 함량 81.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 와 유사한 수준이었다. 이 시험에서 가장 높은 라이코핀 함량을 보여준 조합은 609번 조합으로 149.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 대비종의 181%의 라이코핀 함량을 보여주었다. 이 조합은 적기1 시험(253번조합)에서도 131.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 높은 수준의 라이코핀 함량을 보여주어 라이코핀 함량이 안정적인 조합으로 판단된다. 605번 조합은 143.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 두 번째로 높은 수준의 라이코핀 함량을 보여주었고, 적기1시험에서도(252번 조합)는 109.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 대비종에 비해 높은 수준을 보여주었지만, 지역에 따라서 라이코핀 함량의 차이가 크게 나타났다. 이 조합의 양친 구성은 도홍 × 적색계통간의 조합으로 높은 라이코핀 함량을 보여주었던 극적육 계통이 사용되지 않아, 조합 간의 특수한 관계도 라이코핀 함량에 영향을 미칠 수 있는 것으로 판단된다. 608번 조합은 황피 조합으로 잎, 줄기, 과피 등에 황색의 나타나고 이는 chlorophyll이 해당 조직에서 적게 생성된 것으로 알려져 있고 따라서 동화능력의 감소를 초래하고 과육색이 매우 연해지고 라이코핀 함량이 다른 조합들보다 적게 생성된 것으로 확인되었다. 과육의 적색의 강도와 라이코핀 함량은 일정 정도 정의 상관관계에 있는데, 그림 28을 보면 대비종보다 라이코핀 함량이 높은 조합들(605, 609, 610번)의 육색이 진함을 알 수 있다.

표 28. 라이코펜 조합 특성 및 라이코펜 함량(적기2)

품종	조합구성	과형	과피색	과중(kg)	Brix(%)	육색 ^Z	숙기 ^Y	저장성 ^X	라이코펜함량(µg/mg)	라이코펜함량 대비
601	팔나라	단타원형	호피	6.5	9.9	5	5	5	82.6	100%
602	흑미	단타원형	흑피	5.7	9.7	5	5	5		
603	도홍 × 적	단타원형	호피	7.0	10.8	7	7	5	116.5	141%
604	도홍 × 적	단타원형	흑피	6.1	11.1	8	5	6	134.4	163%
605	도홍 × 적	단타원형	흑피	6.6	11.0	7	7	6	143.4	174%
606	도홍 × 적	원형	흑피	5.8	11.3	6	7	7	118.9	144%
607	적 × 적	단타원형	흑피	7.1	10.8	7	6	7		
608	도홍 × 도	단타원형	황피	6.6	11.7	4	5	6	53.7	65%
609	적 × 극적	단타원형	크림슨	7.8	10.7	8	7	6	149.6	181%
610	극적 × 적	단타원형	흑피	6.1	10.8	8	7	6	137.2	166%
611	적 × 극적	단타원형	흑피	7.8	11.6	8	5	7	123.9	150%
612	도홍 × 적	원형	흑피	6.0	10.8	6	6	7		
613	도홍 × 적	원형	흑피	8.3	11.2	6	5	7		
614	도홍 × 적	원형	흑피	7.6	10.7	5	5	7		
615	도홍 × 적	원형	흑피	8.1	10.9	5	5	7		
616	등황 × 등황	단타원형	호피	6.6	11.7	-	7	7		
617	등황 × 황	단타원형	호피	7.8	11.6	-	6	7		

Z: 숫자가 높을수록 진한 적육색, Y: 숫자가 높을수록 숙기가 빠름, X: 숫자가 높을수록 저장성이 우수

적기2 시험에서 나타난 과육색과 라이코펜 함량과의 관계를 보면(그림 28) 육안으로 관찰하였을 때 610번과 605번에서 가장 진한 과육색을 보여주었고, 라이코펜 함량도 매우 높게 나타났으며, 대비종인 601번은 중간정도의 육색을 보여주었고, 황피 조합인 608번의 경우에 과육색이 매우 연하고 라이코펜 함량도 낮은 수준으로 나타나 과육색의 강도와 라이코펜 함량이 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 확인되었다.



그림 28. 적기2시험의 라이코펜 함량과 과육색

라이코펜 함량의 계절별, 지역별 발현 양상을 살펴보면(그림 29), 전반적으로 저온기보다 적기1과 적기2 시험에서 라이코펜 함량이 증가하였고, 대다수의 조합에서 적기1 시험보다 적기2 시험에서 라이코펜 함량이 약간 더 증가하였는데, 이는 적기1 시험보다 적기2 시험에서의 샘플 채취시기에서 조금 더 숙기가 진전되었던 것과 관련이 있는 것으로 판단된다. 30번 조합의 경우 저온기, 적기1, 적기2 시기의 라이코펜 함량이 각각 149.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 131.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 149.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 시기, 지역에 관계없이 매우 높은 수준의 라이코펜 함량을 보여주어 매우 안정적인 조합으로 판단된다.

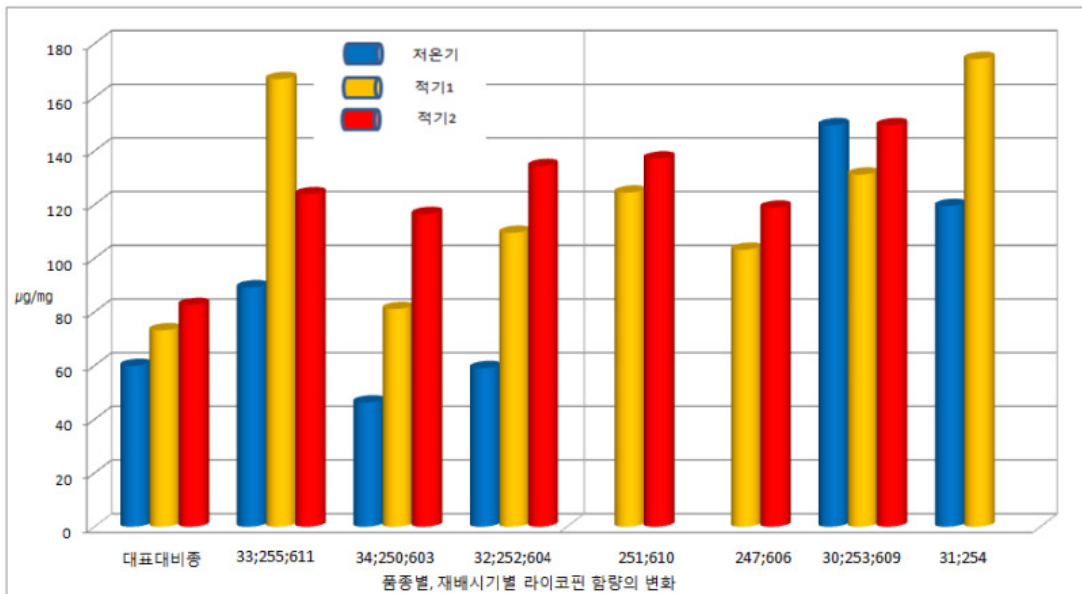


그림 29. 지역별, 재배시기별 라이코펜 함량의 변화

나. 고탐량 라이코핀 조합의 농가실증시험 실시

고함량 라이코핀 조합의 농가실증시험을 위하여 진천군 농업기술센터의 특성화품종 수박재배 시험포장에서 농가실증시험 및 평가를 실시하였다(표 30, 그림 30). 재배시험 결과 대부분의 품종에서 착과 및 비대력이 우수하였고, 20937(30 ; 253 ; 609번 조합과 동일), 20938 조합의 경우 과크기와 품질이 대비종인 삼복꿀보다 우수하였으며, 육색이 진한 고탐량 라이코핀 특성을 보여주어 유망한 조합으로 판단되었다.

표 29. 고탐량 라이코핀 조합 농가실증시험 개요

시험지	공시품종수	과종	정식	조사	비고
진천기술센터	9	2010. 3. 19	2010. 4. 17	2010. 7. 15	진천군 진천읍



그림 30. 농가 실증시험 공시 품종의 외관



그림 31. 진천군 농업기술센터 특성화 품종 비교 재배시험포



그림 32. 진천군 농업기술센터의 고탐량 라이코핀 수박 품질평가회 모습

표 30. 진천기술센터 수박특성화시험포 품종 특성 및 시험성적

품종명	과육색	과피색	과형	특성	과중(kg)	당도(Brix)	당도 ^z	항기 ^z	과육색 ^z
20913	극적육	흑피	원형	고함량 라이코핀	9.6	10.8	9	10	20
20909	극적육	호피	단타원형	고함량 라이코핀	10.6	12.4	22	20	14
20937	극적육	크립슨	단타원형	고함량 라이코핀	11.5	11.9	2	2	8
20938	적육	호피	단타원형	고함량 라이코핀	11.4	12.5	8	7	13
20936	적육	흑피	원형	고함량 라이코핀	10.1	11.3	14	12	17
20923	적육	흑피	단타원형	고함량 라이코핀	10.8	11	4	6	16
20921	극적육	흑피	단타원형	고함량 라이코핀	9.3	10	2	2	19
70928	도홍육	황피	단타원형	고함량 라이코핀	9.7	11.4	-6	-5	0
삼복꿀	적육	호피	단타원형	대비품종	10.8	11.7			

Z: 진천군 수박산학협력단 기술위원 12명의 관능검사에 의해 나뭇 : -2, 조금 나뭇 : -1, 보통

다. 3차년도 고탐량 라이코핀 조합 성능검정

(1) 경종개요

라이코핀 함량이 상이한 조합의 성능 검정은 총 3회에 걸쳐 수행되었다(표 31). 반축성 작형에서의 특성검정을 위해 진천군 덕산면의 농가포장을 임대하여 26품종을 공시하여 수행하였으며 2012년 3월 25일에 파종하여 참박대목 ‘블로장생’에 접목하여 4월 5일에 정식하였으며, 수회의 농가방문을 통해 초형관련 특성, 파형관련 특성 등을 조사하였고, 7월 4일에 당도, 과육색, 식미 등의 특성을 조사하였으며 조사 시 과육을 채취하여 라이코핀 함량 추정을 의뢰하였다. 비가림작형 특성검정시험은 고창군 무장면의 농가포장에서 대비종 포함 6품종을 공시하여 수행하였으며, 2012년 3월 1일에 파종하여, 참박대목 ‘블로장생’에 접목하여 4월 9일 정식하였고, 7월 5일 수확 조사하였다. 노지작형에서의 특성검정시험은 고창군 무장면의 노지포장에서 4 품종을 공시하여 수행하였으며, 2012년 3월 20일에 파종하여, 참박대목

표 31. 고탐량 라이코핀 조합의 특성검정 시험 개요

구분	파종일	정식일	조사일	시험지역	공시품종	재배면적	비고
반축성	11. 2. 25	11. 4. 5	11. 7. 4	진천 덕산	26 품종	200평	농가실증시험
비가림	11. 3. 1	11. 4. 9	11. 7. 5	고창 무장	6 품종	400평	라이코핀추출
노지	11. 3. 20	11. 4. 20	11. 7. 22	고창 무장	4 품종	300평	라이코핀추출

‘블로장생’에 접목하여 4월 20일 정식하였고, 7월 22일 수확 조사하였다.

(2) 반축성 조합성능검정

비가림 작형의 조합성능검정은 대비종, 라이코핀 함량이 상이한 조합, 씨 없는 수박 등 총 26 품종이 공시되어 수행되었다. 대비종으로는 삼복꿀이 공시되었고, 삼복꿀의 과육색으로 본 조합구성은 도홍 × 도홍이다. 삼복꿀 및 삼복꿀과 유사한 조합구성을 갖고 있는 #510의 경우 라이코핀 함량이 각각 $171.7\mu\text{g}/\text{mg}$, $170.5\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타나 한국의 품종들의 일반적인 라이코핀 함량이 이 정도인 것으로 확인되었다. 본 시험에 공시된 조합구성은 적육 또는 극적육간의 조합구성으로 육안으로도 과육색의 정도가 일반 도홍색 품종보다 진하게 보여진다. 각 조합들의 라이코핀 함량 및 원예적 형질 특성은 표 31에 정리되어 있다.

표 32에 나타난 바와 같이 가장 높은 라이코핀 함량을 보여준 조합은 #505로 $336.1\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타나 대비종보다 2배 이상 높은 라이코핀 함량을 보였다(그림 34). 이 조합의 경우에 당도도 대비종은 11.1%인데 반해 12.5%로 매우 높게 나타나 우수한 과육특성을 보여주었다. 그러나 과형균일도나 저장성에서 대비종보다 열악한 특성을 보여 재배안정성이 낮은 것으로 판단되었다. 이 조합의 경우에 라이코핀 함량이 매우 높기 때문에 라이코핀 추출전용 품종 또는 당도와 육색이 우수한 장점을 살릴 수 있는 주스 및 가공용 품종으로 유망한 것으로 판단되어 일차적으로 선발되었으며 국내 또는 해외에 추가시험을 할 예정이다.

#502의 경우에 라이코핀 함량이 $338.2\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 대비종보다 2배 가까이 높은 함량을 보여주고 있고, 당도도 대비종보다 높고, 기타 원예적 형질에서도 무난한 정도의 특성을 보여주어 유망한 조합으로 판단된다(그림 33, 35). 이 조합은 고창군 무장면에서 수행된 비가림시험과 노지시험에서 #1로 공시된 품종으로 라이코핀 함량이 대비종보다 매우 높은 것으로 나타나 매우 유망한 품종으로 선발되었으며 2011년도에 충북 진천에서 수행된 적기시험에서 #255로 공시된 조합으로서 라이코핀 함량이 대비종보다 2.3배 높았고, 당도 및 기타 원예적형질도 우수하였으므로 품종의 안정성도 확인되어 품종보호를 출원하였다.

#503번의 경우 조합구성이 극적육 × 극적육의 조합으로서 라이코핀 함량이 $283.8\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 대비종보다 65% 높았으며 당도는 대비종과 유사한 수준으로 숙기가 빠르고 비대력도 우수하여 유망한 중조생계 조합으로 선발되었다. 또한 이 조합은 고창군에서 수행된 비가림 시험과 노지시험에서 #2로 공시되어 품종의 우수성이 재확인되었다(그림 36).

#504번의 경우 라이코핀 함량이 대비종보다 78% 높았으며 당도도 높았고, 특히 과형균일도가 높아 재배안정성도 우수한 것으로 판단되었다. 이 조합은 고창군에서 수행된 비가림 시험과 노지시험에서 #3으로 공시되어 당도 및 기타 원예적형질도 우수한 조합으로 선발되어 품종보호를 출원하였다(그림 37).

#524번은 3배체 조합으로 조합구성은 일반적인 품종과 동일한 도홍 × 도홍인데, 라이코핀 함량은 동일한 조합구성을 보이는 삼복꿀(#501)보다 22% 높은 함량을 보였다. 이는 2배체의 염색체 구성이 2n인데 반해 이 조합은 3n으로 염색체 배율이 높아 나타나는 dosage effect로 판단되며, 조합 구성이 적육 × 적육인 품종을 3배체화하면 라이코핀의 함량이 2배체 고품량 라이코핀의 함량보다 높을 것으로 기대되며 2013년도에 확인할 계획이다(그림 38).

표 32. 라이코펜 조합 특성 및 라이코펜 함량(반측성)

품종	조합구성	과형	과피색	과중(kg)	당도(Brix)	과형균일 ^Z	육색 ^Y	숙기 ^X	저장성 ^W	라이코펜 함량($\mu\text{g}/\text{mg}$)	라이코펜 함량비(%)
501	삼복꽃	단타원형	호피	9.6	11.1	5	5	5	5	171.7	100
502	적 × 극적	단타원형	흑피	8.4	12.4	4	7	6	5	338.2	197
503	극적 × 극적	단타원형	흑피	9.4	11.4	5	7	7	4	283.8	165
504	극적 × 극적	단타원형	흑피	8.3	11.7	6	7	7	4	305.5	178
505	극적 × 극적	단타원형	흑피	7.8	12.5	4	7	7	3	366.1	213
506	극적 × 극적	단타원형	호피	8.1	10.8	5	7	7	5	314.5	183
507	극적 × 극적	단타원형	크림슨	7.8	10.6	5	7	6	6	207.7	121
508	극적 × 극적	단타원형	흑피	7.9	12.6	5	7	4	5	293.9	171
509	극적 × 극적	단타원형	호피	7.7	10.4	5	7	7	4	259.9	151
510	도홍 × 도홍	단타원형	흑피	8.8	10.5	6	5	4	6	170.5	99
523	적 × 도홍	단타원형	크림슨	3.8	12.7	5	5	9	3	222.9	130
524	도홍 × 도홍	단타원형	호피	7.8	11.7	6	6	6	4	208.9	122

Z : 숫자가 높을수록 균일도 우수, Y : 숫자가 높을수록 진한 적육색, X : 숫자가 높을수록 숙기가 빠름, W : 숫자가 높을수록 저장성이 우수

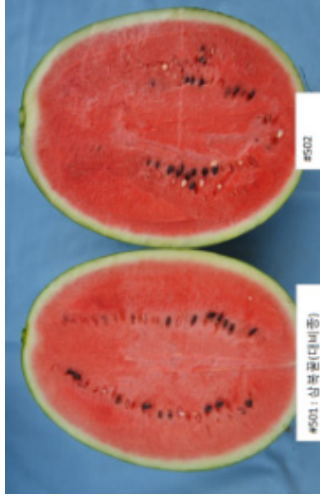


그림 33. 대비종과 선발품종(502)의 과육색 비교



그림 34. 선발품종(505)의 과육, 과피



그림 35. 선발품종(502)의 과육, 과피



그림 36. 선발품종(503)의 과육, 과피



그림 37. 선발품종
(504)의 과육, 과피



그림 38. 선발품종
(524)의 과육, 과피

(3) 비가림 작형 조합 성능검정(고창)

본 비가림 작형의 주요 시험목적은 고품량 라이코핀 조합의 원예적 특성, 수량 등과 아울러 라이코핀 추출을 위한 전용품종의 가능성 등을 타진해보는 것이었다. 본 시험은 대비종으로 삼복꿀과 5개의 고품량 라이코핀 품종들을 공시하여 전북 고창군 무장면의 수박 재배 농가의 비가림 시설에서 수행되었다. 착과 후 40일 째에 과중, 당도, 라이코핀 함량을 조사하였고, 라이코핀을 추출하는 시험은 착과 50일 된 과일을 대상으로 수행하였다(표 33).

#1(그림 42, 43, 44)의 경우 반축성에서 #502번으로 공시되었던 조합으로 40일 째에 조사한 라이코핀 함량은 일반품종인 삼복꿀이 $54.5\mu\text{g}/\text{mg}$ 에 비해서 $147.2\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 라이코핀 함량이 2.7배로 매우 높은 것으로 나타났으며, 반축성 작형에서도 1.97배로 높아서 작형에 관계없이 매우 높은 수준으로 안정적인 것으로 판단된다. 그리고 당도는 대비종에 비해서 반축성 재배에서는 1.3도, 본 비가림 재배에서는 1.7도 높게 나타나 대비종보다 일관되게 높았다. 과일크기는 대비종보다 약간 낮은 것으로 나타났다.

#2(그림 45, 46)의 경우 라이코핀 함량은 $109.6\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 대비종보다 2배 높았으며, 반축성 시험(#503)에서도 대비종의 약 1.65배 정도 높은 것으로 조사되어 이 품종의 라이코핀 함량은 재배 시기에 관계없이 높은 수준을 보여주었다. #2의 당도는 대비종보다 높고, 과크기는 약간 낮은 것으로 나타났다.

#3(그림 47, 48)번의 경우 라이코핀 함량이 대비종보다 1.8배 높았으며 반축성 시험(#504)에서도 1.7배 높아 역시 고품량 라이코핀 특성이 안정적으로 발현하는 것을 알 수 있었다. 당도는 대비종보다 높았고, 과크기는 대비종보다 낮았다.

#9(그림 49, 50, 51), #10(그림 52, 53, 54)의 경우 라이코핀 함량이 대비종보다 약간 높은 수준으로 나타났지만 극적육 × 극적육 조합으로서는 예상보다 낮은 함량을 보여주어 이것이 품종 고유의 특성인지, 재배과정이나 시료의 문제인지는 추후 확인해볼 필요가 있다.

착과 후 40일과 50일 된 과일의 과육특성을 비교해보면 숙기가 진행될수록 당도는 약간 높아지고 라이코핀 함량은 약간 감소하는 것으로 나타났다.

본 시험에서 공시된 라이코핀 조합들은 대부분 대비종에 비해 과크기가 작은 것으로 나타났는데, 이는 현재의 재배방법이 대비종에 최적화되어 있기 때문으로 개별 품종의 특성(주로 초세가 강함)에 맞는 재배방법을 적용하면 대비종에 버금가는 수량을 보일 것으로 판단된다.

최근 라이코핀의 이용에 있어서 과육을 통한 섭취 뿐 아니라 화장품, 식음료의 첨가물 형태로 소비가 확대되고 있어서 라이코핀 추출의 산업화 가능성이 높아지고 있다. 따라서 수박 재배 과정 중에 발생하는 시판을 할 수 없는 저등급 수박에서 라이코핀을 추출하여 농가소득을 얻고 또한 라이코핀 추출 전용 품종으로서의 가능성을 확인하기 위해 착과 후 50일된 과를 품종별로 일정량 채취하여 정제된 라이코핀을 추출하는 시험을 수행하였다. 시험 결과 대비종에서는 2.47g/100kg이 추출되는데 반해 고탐량 라이코핀 품종인 #2에서는 6.58g/100kg이 추출되어 2.6배나 많은 정제된 라이코핀을 얻을 수 있었다. #3의 경우에도 대비종보다 56% 더 많은 정제 라이코핀을 추출할 수 있었다. 이로서 고탐량 라이코핀 품종의 경우 기존 품종보다 라이코핀 추출용으로써의 활용도가 높아 수박과일시세 등에 따라 탄력적으로 수박판매 및 라이코핀 추출을 할 수 있어 농가소득향상에도 기여할 것으로 판단된다.

본 시험을 통하여 고탐량 라이코핀의 품종 특성 조사와 더불어 고탐량 라이코핀 수박의 시범포를 활용하여 라이코핀의 함량, 생산비용, 생육상태, 품질평가 등을 통해 고탐지역의 적합한 라이코핀 수박 산업화의 다양한 가능성을 모색하는 자리를 마련하였다. 7월 4일에 개최된 시범포 견학에는 고탐군 관계자, 고탐군 읍, 면별 수박작목반 대표, (주)뉴트라라이코 고탐 담당자, 관련 업체종사자 등 약 30여명이 참석하여 평가 및 의견교환을 하였다(그림 39, 40, 41). 이 시험에서는 수량, 과품질 등 많은 부분에서 참석자들로부터 가장 좋은 평가를 받은 품종은 #2였다



그림 39. 고탐 시험포 전경



그림 40. 품종 특성 설명



그림 41. 시식회 및 과육특성평가



그림 42. #1 착과상태



그림 43. #1 과피 및 과형



그림 44. #1 과육



그림 45. #2 착과상태



그림 46. #2 과육



그림 47. #3 착과상태

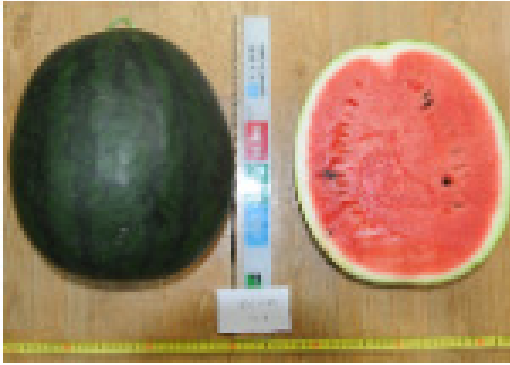


그림 48. #3 과육



그림 49. #9 착과상태



그림 50. #9 과피 및 과형



그림 51. #9 과육



그림 52. #10 착과상태



그림 53. #10 과피 및 과형



그림 54. #10 과육

표 33. 라이코펜 조합 특성 및 라이코펜 함량(비가림)

과형	조합구성	과형	과피색	착과 40일			착과후 50일			라이코펜 추출		
				과중 (kg)	당도 (%)	라이코펜 함량(μg/mg)	라이코펜 함량대비(%)	과중 (kg)	당도 (%)	라이코펜 함량(μg/mg)	추출량 (g/100kg)	추출율 (%)
				삼부끝	도홍 × 도홍	단타원형	호피					
#1(502)	적 × 극적	단타원형	흑피	8.3	9.7	147.2	270	7.5	10.4	130.0	6.58	266
#2(503)	극적 × 극적	단타원형	흑피	8.9	9.2	109.6	201	9.1	9.3	82.0		
#3(504)	극적 × 극적	단타원형	흑피	7.8	8.6	99.4	182	7.2	9.3	79.0	3.85	156
#9	극적 × 극적	단타원형	흑피			77.6	142	7.6	9.3			
#10	적 × 극적	단타원형	크림슨			80.2	147	9.2	8.8			

(4) 노지 작형 조합 성능검정(고창)

노지 작형에서는 방임재배를 통해 라이코펜 성분 추출의 최대화를 위해 방임재배를 통해 재배노력을 줄이고 수량을 높이는 목적으로 시험재배가 수행되었으나 잦은 강우 등으로 인해 작황이 좋지 않아서 정확한 수량 및 라이코펜 추출에 대한 평가는 이루어지지 못하였고, 수확된 과의 가식부위의 라이코펜 함량만을 측정할 결과 고함량 라이코펜 품종의 경우 라이코펜 함량이 전반적으로 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다(표 34, 그림 55).

표 34. 라이코펜 함량 비교(노지시험)

품종	#3	#9	#10
라이코펜 함량(μg/mg)	80.34	89.48	75.45



그림 55. 노지방임재배모습

(5) 유망품종 품종보호출원

2011년도와 2012년도의 시험에서 재배안정성이 우수하고 라이코핀 함량이 높고 과육특성도 우수한 품종으로 선발된 2개의 조합에 대해서는 품종보호 출원을 하였다.

① 리코스위트 1호(Lycosweet #1)

#502(#1)로 공시되어 라이코핀 함량이 높은 특성을 가진 조합으로 선발되어 리코스위트 1호로 명명하고 품종보호를 출원하였다(그림 56, 57, 58, 59).



그림 56. 대비종(왼쪽)과 리코스위트1호의 대비



그림 58. 리코스위트1호의 착과



그림 59. 리코스위트 1호 과형

민원인술 가족같이, 민원술 내일같이	
등지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다. 담당자: 서주연 전화: (031) 467-0111 FAX: (031) 467-0116 인터넷 홈페이지: www.seed.ro.kr 490-016 경기도 안양시 만안구 안양로 184	
품종보호출원번호 통지서	
출원일자: 2011.10.24	품종보호 출원번호: 출원 2011 - 484 품종명칭 출원번호: 명칭 2011 - 1220
작 품 명: 수박	
품종 명칭: 리코스위트1호	
출 원 인: 파토너종묘	
주 소: 경기 안성시 이양면추평리 269-20	
2011년 10월 24일	
국립종자원	

그림 57. 리코스위트 1호 품종보호출원번호 통지서

②리코스위트 2호(Lycosweet #2)

#504(#3)로 공시되어 라이코핀 함량이 높은 특성을 가진 조합으로 선발되어 리코스위트 2호로 명명하고 품종보호를 출원하였다(그림 60, 61, 62).



그림 60. 대비종(#501), 리코스위트 2호(502) 대비



그림 61. 리코스위트 2호 작과

민원인을 가족같이, 민원을 내일같이	
통지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다. 담당자: 서주연 전화: (031) 467-0111 FAX: (031) 467-0116 인터넷 홈페이지: www.seed.co.kr 430-018 경기도 안양시 단원구 안양로 184	

품종보호출원번호 통지서

출원일자: 2011.10.24	품종보호 출원번호: 출원 2011 - 485 품종명칭 출원번호: 명칭 2011 - 1221
------------------	---

작 물 명: 수박
 품종 명칭: 리코스위트2호
 출 원 인: 파르너종교
 주 소: 경기 안성시 미양면후평리 209-20

2011년 10월 24일


국립종자원 

그림 62. 리코스위트 2호
품종보호출원번호 통지서

라. 4차년도 고탐량 라이코핀 조합 성능검정

(1) 경종개요

라이코핀 함량이 높고 품질이 우수한 조합을 선발하기 위한 조합성능검정은 총 2회에 걸쳐 수행되었다(표 35). 반축성 작형에서의 포장검정을 위해 충북 진천군 덕산면의 농가 비닐하우스를 임대하여 대비종 품종을 포함하여 총 36품종을 공시하여 수행하였으며, 2012년 2월 28일에 파종하여 참박대목인 ‘불로장생’에 접목하여 4월 4일에 정식하였다. 활착단계, 순정리단계, 착과단계, 비대기, 성숙기단계 등 수회의 포장조사를 통해 초형관련 특성, 과형관련특성 등을 조사하였고, 7월 5일에 과형, 과피색, 과중, 당함량, 과형균일도, 과육색, 숙기 등을 조사하였다. 또 다른 반축성 작형 시험은 경기도 안성시 미양면에 위치한 파트너종묘의 육종연구소에서 대비종 포함 14조합을 공시하여 수행하였다. 2012년 3월 1일에 파종하여 참박대목인 ‘불로장생’에 접목하여 4월9일에 정식하였으며 7월5일 조사하였다.

조사 시기에 진천군 농업기술센터 지도사, 이서종묘 대표, 영업부 직원 등 15명의 종묘업계 관계자들과 공동 조사를 통해 품종 선발, 마케팅 방향 등에 대해 의견을 나누었다. 또한 조사과정에서 우수한 특성을 보인 조합들에서는 일정량의 과육을 채취하여 냉동보관 후에 라이코핀 함량을 서울대학교에 의뢰하여 측정하였다(2013년도 라이코핀 함량의 측정결과는 이제까지의 측정결과 및 육안으로 판단한 과육색의 진한 정도 등과는 상이한 결과를 보여주어 신뢰도가 높지 않은 편이다). 라이코핀 분석은 수박 시료 2g에 hexane : acetone : ethanol (2:1:1, v/v/v) 20ml을 넣고 250 rpm에서 10분간 추출하였다. 추출물에 10ml의 물을 가하고 다시 5분 동안 혼합해주었다. 시료를 2,900rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 유기용매 층(상위 층)을 40℃에서 감압 농축 하였다. 추출물에 MTBE 용액 10ml로 용해시키고 0.2 μ m PTFE syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

표 35. 고탐량 라이코핀 조합의 특성검정 시험 개요

구분	파종일	정식일	조사일	시험 지역	공시품종	재배면적	비고
반축성 (진천)	12. 2. 28	12. 4. 4	12. 7. 5	진천 덕산	36 품종	200평	농가실증시험
반축성 (안성)	12. 3. 1	12. 4. 9	12. 7. 5	안성 미양	14 품종	200평	농가실증시험

(2) 반축성 조합성능검정(진천)

반축성 작형의 조합성능검정시험은 대비종으로 삼복꿀수박을 이용하였고, 라이코핀 함량이 상이한 총 36조합이 공시되었는데, 그중에서 품질이 우수하고 라이코핀 함량이 높아 선발된 조합의 특성이 표 36에 나타나있다.

표 36. 라이코펜 조합 특성 및 라이코펜 함량(반측성, 진천)

품종	조합구성	과형	과피색	과중(kg)	당도(Brix)	과형 균일 ^z	육색 ^y	숙기 ^x	저장성 ^w	라이코펜 함량 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	라이코펜함량비 (대비종 대비, %)
1201	대비종	단타원형	호피	11.8	11.5	7	5	5	7	52.6	100%
1248	적 × 극적	단타원형	후피	11.3	14.4	4	7	6	6	50.9	97%
1249	도홍 × 적	원형	후피	12.5	13.5	6	7	6	5	49.8	95%
1250	적 × 극적	단타원형	후피	12.5	13.4	6	7	6	5	55	105%
1251	적 × 도홍	단타원형	후피	12.9	11.6	6	6	4	7	74	141%
1252	적 × 적	원형	후피	10.8	13.7	6	8	6	6	64	122%
1253	적 × 도홍	단타원형	후피	13.1	12.1	5	7	6	6	79.5	151%
1259	극적 × 극적	단타원형	후피	11.8	13.5	7	8	6	5	88.4	168%
1260	극적 × 극적	단타원형	호피	8.6	13.7	7	8	7	5	63.3	120%
1261	극적 × 극적	단타원형	크림슨	9.8	12.8	5	8	7	5	64	122%
1262	극적 × 극적	단타원형	호피	9.5	12.5	6	8	7	6	93.4	178%
1263	극적 × 적	원형	후피	9.2	13.3	5	8	7	6	63.1	120%
1264	극적 × 도홍	원형	호피	8.6	13.2	6	7	7	7	64.5	123%
1265	극적 × 극적	단타원형	크림슨	10.4	12.2	6	8	7	6	60.4	115%

Z: 숫자가 높을수록 균일도 우수, Y: 숫자가 높을수록 진한 적육색, X: 숫자가 높을수록 숙기가 빠름, W: 숫자가 높을수록 저장성이 우수

#1201 : 반측성 시험에서 가장 시장점유율이 높은 대표적인 품종으로써 대비종으로 이용된 삼복꿀수박은 오랫동안 판매된 품종으로 재배가 매우 안정적인 품종이다. 육색은 도홍색으로 라이코펜 함량이 재배가 안정적인 품종으로써 52.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이다.

#1248 : 본 과제를 통하여 품종보호출원 된 '리코스위트 1호'로 재배 3년차에서도 당도가 매우 높고(14.4 Brix), 과육색도 극적육색을 띄고 있어서 라이코펜 함량이 매우 높은 것으로 2, 3차년도 연구에서 확인되었으나, 금년의 시험에서 라이코펜 함량은 대비종과 유사한 수준으로 나타났으나, 기존 결과와는 다른 부분이 많이 나타나 분석결과와의 불안정성이 있는 것으로 판단되어 결과의 신뢰성이 부족하다는 판단이 든다.

#1249 : 조합 구성이 도홍 × 적육색의 조합으로써 후피 원형조합으로 당도가 13.5 Brix로 대비종보다 높고, 비대력도 우수하며, 과육색은 진한 적색을 보여주어 라이코펜 함량이 높은 것으로 판단되나 실제 라이코펜 함량측정에서는 이를 뒷받침하는 결과를 얻지는 못하였다.

#1250 : 조합 구성이 적육 × 극적육색의 조합으로써 흑피 원형조합으로 숙기는 약간 빠른 편으로 당도가 13.4 Brix로 대비종보다 높으며, 과육색은 극적육색을 띄고 있고 비대력과 재배안정성이 우수한 기능성품종으로 가능성이 높아 2013년도에 공시하여 우수한 특성이 재확인되면 품종등록을 할 계획이다(그림 63).



그림 63. #1250 조합의 과형 및 과육

#1251 : 조합 구성이 적육 × 도홍인 흑피 단타원형 조합으로 비대력이 매우 우수하고 숙기는 약간 늦은 편으로 재배안정성이 매우 높은 것으로 판단된다. 이 조합은 흑서기에 수확하는 작형에서 품종의 장점이 쉽게 나타날 수 있을 것이다(그림 64).



그림 64. #1251 조합의 과형 및 과육

#1252 : 조합 구성이 적 × 적육인 흑피원형계 조합으로 과육색이 육안평가에서 가장 높은 수준을 보여주었고, 당도 또한 13.7 Brix로 매우 높은 조합으로 식미 또한 대비종보다 우수하다. 작년시험에 이어서 우수한 평가를 받은 매우 유망한 조합이다(그림 65).



그림 65. #1252 조합의 과형 및 과육

#1253 : 조합 구성이 적육 × 도홍인 흑피단타원형 조합으로 당도가 높고 육색이 진한 조합으로 착과력이 높아 과형이 균일하며 비대력이 우수한 조합으로 수량성 및 품질에서 모두 양호한 특성을 보여주어 상업화가능성이 매우 높은 특성을 보여주었다. 이 조합은 함안, 고창 등에서도 조합성능시험을 통하여 선발된 조합이다(그림 66).



그림 66. #1253 조합의 과형 및 과육

#1259 : 조합 구성이 극적육 × 극적육인 흑피단타원형 조합으로 당도가 대비종보다 매우 높고, 육색이 매우 진한 특성을 보여주고 있어서 라이코핀 함량이 매우 높을 것으로 판단된다.

#1260 : 양친 모두 극적육인 계통간의 조합으로 호피단타원형인 중과종 품종으로써 숙기가 빠르고, 식미가 우수하며 치감이 우수한 것으로 평가되었다. 최근 중과종이 점차 선호되는 추세에 적당한 품종으로 판단된다.

#1261 : 조합구성이 극적육 × 극적육인 크림슨 단타원형 조합으로 숙기가 빠르며 과육색이 매우 진한 극적육색을 보여주고 있어서 라이코핀 함량이 높을 것으로 판단된다. 이 조합은 안성시험에서 동일한 번호로 공시되어 시험되었는데, 과육색 특성, 숙기 등에서는 두 지역모두 유사한 특성을 보여주었는데, 라이코핀 함량에서는 진천에서는 대비종과 유사한 정도(대비종 대비 122%)인데, 안성시험에서는 대비종 대비하여 212%의 함량을 보여주어 측정된 라이코핀 함량결과는 지역에 따라 많은 차이를 보여주었다.

#1262 : 조합 구성이 극적육 × 극적육인 호피 단타원형 조합으로 숙기가 빠르며 과육색이 매우 진하고, 육질이 연하여 2012년도에 라이코핀 추출용 품종으로 유망할 것으로 선발된 조합으로 금년에도 유사한 특성을 보여주었다. 라이코핀 함량 측정 결과에서 대비종보다 78% 높은 결과를 보여주었다. 이 조합은 안성시험에서 동일한 번호로 공시되어 시험되었는데, 과육색 특성, 숙기 등에서는 두 지역모두 유사한 특성을 보여주었으나, 라이코핀 함량 측정 결과 안성시험에서는 대비종 대비하여 212%의 함량을 보여주어 측정된 라이코핀 함량결과는 지역에 따라 상당한 정도의 차이를 보여주었다.

#1263 : 조합 구성이 극적육 × 적육인 중과종 흑피 원형 품종으로 높은 당 함량, 진한 과육색 특성, 과육의 경도가 매우 높고, 저장성이 높은 특성, 과피가 얇아 가식부위가 많은 특성 등으로 생식용 및 fresh-cut용으로 높은 가능성을 보여주는 조합이다. 이 조합은 안성연구소에서 수행된 시험(#1511)에서도 동일한 특성을 보여주어 매우 유망한 조합으로 선발되었으며 ‘리코 후레쉬 1호’로 품종 보호 출원되었다.

#1264 : 조합 구성이 극적육 × 도홍인 중과종 호피 원형 품종으로 #1263과 동일한 모계를 사용

한 조합으로 높은 당 함량, 진한 과육색, 높은 과육의 경도, 얇은 과피 등으로 생식용 및 fresh-cut용으로 가능성이 높은 조합으로 선발되어 ‘리코후레쉬 2호’로 명명되어 품종 보호 출원되었다. 이 조합 또한 안성연구소의 시험(#1512)에서도 우수한 특성을 보여주었다.

#1265 : 조합구성이 극적육 × 극적육인 진한 크림슨과피의 타원형품종으로 과육색이 매우 진하며 당도가 우수하고 과피가 얇고, 과육의 경도 또한 양호한 조합으로 라이코핀 추출용으로도 우수한 것으로 판단되었다(그림 67).



그림 67. #1265 조합의 과형 및 과육

(3) 반축성 조합성능검정(안성)

파트너종묘 안성연구소에서 수행된 반축성 작형의 조합 성능 검정 시험은 대비종으로 삼복꿀수박을 이용하였고, 고품량 라이코핀 수박 등 총 14조합이 공시되었는데, 그중에서 품질이 우수하고 라이코핀 함량이 높아 선발된 조합의 특성이 표 37에 나타나있다.

#1501 : 대비종으로 이용된 삼복꿀수박으로 조합 구성은 도홍 × 도홍이고, 라이코핀 함량은 45.9 μ g/mg을 보여주었다. 시험구위치로 인하여 과중이 7.1kg로 본 특성보다 과소평가되었고, 적정 크기는 약 10kg정도 될 것으로 판단된다.

#1506 : 조합 구성이 도홍 × 극적육인 단타원형 호피 조합으로 삼복꿀의 조합구성의 부계를 극적육으로 치환한 조합으로 육색이 약간 진해졌고, 숙기가 약간 빨라졌다. 라이코핀은 과실이 익어갈수록 함량이 증가하는 것이기 때문에 라이코핀 함량이 높은 조합은 대체적으로 숙기가 빨라지고 당도는 높아지는 경향을 보여준다.

#1507 : 조합구성이 적육 × 극적육인 단타원형 흑피 조합으로 2012년도에 ‘리코스위트 1호’로 품종 보호 출원된 품종이다. 2013년도 시험에서도 당 함량이 대비종보다 매우 높게 나타났고, 과육색이 매우 진한 특성을 보여주었다. 라이코핀 함량은 대비종에 비해 145% 더 높아, 지역 및 시기에 따른 특성변화가 매우 적은 품종으로 판단된다.

#1508 : 조합 구성이 극적육 × 극적육인 단타원형 흑피조합으로 육색이 매우 진하고, 당도도 대비종보다 매우 높은 특성을 보여주었고, 또한 대비종보다 비대력도 우수하여 보여주는 품종이다.

표 37. 라이코펜 조합 특성 및 라이코펜 함량(반측성,안성)

품종	조합구성	과형	과피색	과중(kg)	당도(Brix)	과형균일 ^Z	육색 ^Y	숙기 ^X	라이코펜 함량($\mu\text{g}/\text{mg}$)	라이코펜 함량비 (대비종 대비, %)
1501	삼복꽃	단타원형	호피	7.1	11.7	5	5	5	45.9	100
1506	도홍 × 극적	단타원형	호피	10.2	12.7	4	6	6	43.5	95
1507	적 × 극적	단타원형	흑피	8.3	13.8	4	8	6	112.3	245
1508	극적 × 극적	단타원형	흑피	10.1	13.2	6	8	6	89.3	195
1509	극적 × 극적	단타원형	흑피	8.6	13.5	6	8	6	87.9	192
1510	극적 × 극적	단타원형	호피	8.4	12.5	7	7	7	112.4	245
1511	극적 × 적	원형	흑피	8.5	14.0	7	8	7	91.2	199
1512	극적 × 도홍	원형	호피	8.9	14.0	7	8	7	79	172
1513	극적 × 도홍	원형	크림슨	7.3	12.3	7	7	7	76.2	166
1514	도홍 × 적	원형	흑피	9.5	13.1	5	6	5	57.7	126
1515	적 × 극적	단타원형	흑피	11.1	12.7	7	7	6	65.2	142
1517	적 × 극적	단타원형	흑피	9.3	13.4	7	7	6	46.4	101
1261	극적 × 극적	단타원형	크림슨	8.2	11.9	7	8	7	96.4	210
1262	극적 × 극적	단타원형	호피	8.9	12.7	7	8	7	111.4	243

Z: 숫자가 높을수록 균일도 우수, Y: 숫자가 높을수록 진한 적육색, X: 숫자가 높을수록 숙기가 빠름, W: 숫자가 높을수록 저장성이 우수

#1509 : 조합 구성이 적육 × 극적육인 단타원형 흑피조합으로 2012년도에 ‘리코스위트 2호’로 품종 보호 출원 된 품종이다. 2013년도 시험에서 도 당 함량이 대비종보다 매우 높게 나타났고, 과육색이 매우 진한 특성을 보여주었다. 라이코펜 함량은 대비종보다 92% 더 높아, 지역 및 시기에 따른 특성변화가 매우 적은 품종으로 판단된다(그림 68).



그림 68. #1509 조합의 과육

#1510 : 조합 구성이 극적육 × 극적육인 단타원형 호피조합으로 육색이 진하고 숙기가 빠르며, 균일성이 높은 중과종 조합으로 당도가 높고 라이코펜 함량도 대비종보다 약 2.5배 정도 높은 특성을 보여주고 있다. 이 품종은 높은 균일성, 높은 라이코펜 함량 등이 특성을 지녀 생식용 및 fresh-cut용 품종으로 가능성이 있다(그림 69).



그림 69. #1510 조합의 과육



그림 70. #1511 조합의 과육

#1511 : 조합 구성이 극적육 × 적육인 중과종 흑피 원형 조합이다. 육색이 매우 진하며 당도가 대비종이 11.7 Brix인데 비하여 조사 과일 모두에서 매우 균일한 14 Brix를 보여주었으며, 육질 또한 매우 단단하여 저장성도 우수한 특성을 보여주었다. 라이코펜 함량 특성은 대비종보다 2배 높은 특성을 보여주고 있다. 이 조합은 진천시험에서 #1263으로 공시되어 유사한 특성을 보여주어 매우 안정적인 특성을 갖고 있는 유망한 조합으로 판단된다. 이 조합은 생식용 및 fresh-cut용으로 '리코후레쉬 1호'로 품종 보호 출원 되었으며, 현재 유럽, 일본, 스페인, 인도 등에서 활발한 시교사업이 진행 중이다(그림 70).

#1512 : 조합 구성이 극적육 × 도홍인 중과종 호피 원형 조합이다. 육색이 매우 진하며 당도가 대비종이 11.7 Brix인데 비하여 조사 과일 모두에서 매우 균일한 14 Brix를 보여주었으며, 육질 또한 매우 단단하여 저장성도 우수한 특성을 보여주었다. 라이코펜 함량 특성은 대비종보다 높은 특성을 보여주고 있다. 이 조합은 진천시험에서 #1264로 공시되어 유사한 특성을 보여주어 매우 안정적인 특성을 갖고 있는 유망한 조합으로 판단된다. 이 조합은 생식용 및 fresh-cut용으로 '리코후레쉬 2호'로 품종 보호 출원 되었으며 현재 유럽, 일본, 스페인, 인도 등에서 활발한 시교사업이 진행 중이다. 베트남시험에서 품질의 우수성, 재배안정성 등이 높게 평가되어 25kg의 수출주문을 받은 품종이다(그림 71).

#1513 : 조합 구성이 극적육 × 도홍인 중과종 크림슨 원형 조합이다. 육색이 매우 진하며 숙기가 빠르고 육질도 단단하다. 이 조합은 과피 특성이 미국, 유럽지역에서 선호하는 크림슨과피를 갖고 있어서 미국, 유럽의 중과종 시장에서 생식용 및 fresh-cut용으로 선호될 수 있는 조합으로 판단된다. 당도 및 라이코핀 함량이 대비종보다 우수하였다(그림 72).



그림 71. #1512 조합의 과육



그림 72. #1513 조합의 과육

#1514 : 조합 구성이 도홍 × 적육인 흑피 원형 조합으로 육색이 진하고, 당도가 높은 안정적인 조합이다. 라이코핀 함량도 대비종보다 약간 높은 특성을 보여주었다(그림 73).

#1515 : 조합 구성이 적육 × 극적육인 흑피 단타원형 조합으로 비대력이 우수하고, 과형균일도가 높고, 안정감이 높은 특성을 보여주었고, 육색이 진하며 라이코핀 함량이 대비종보다 45% 더 높았으며, 진천에서 수행된 시험(#1250)에서도 유사한 특성을 보여주어 기능성흑피수박으로 유망한 조합으로 판단된다(그림 74).



그림 73. #1514 조합의 과형 및 과육



그림 74. #1515 조합의 과형 및 과육

#1517 : 조합 구성이 적육 × 극적육인 흑피 단타원형 조합으로 당도가 특히 높았으며(13.4 Brix, 대비종11.7 Brix), 육색이 진하고 과형의 균일도가 높아 기능성흑피수박으로 유망할 것으로 판단된다(그림 75).

#1261 : 조합 구성이 극적육 × 극적육인 크림슨 단타원형 조합으로 육색이 매우 진하고 라이코핀 함량이 매우 높은(대비종의 210%) 특성을 보여주고 있다. 또한 당 함량도 매우 높아 생

식용 및 라이코핀 추출용 품종으로의 가능성이 높은 조합으로 선발되었다. 진천의 시험에서도 동일한 번호로 공시되어 시험되었는데, 유사한 특성을 보여주었다.



그림 75. #1517 조합의 과형 및 과육

#1262 : 조합 구성이 극적육 × 극적육인 단타원형 호피 조합으로 육색이 매우 진하고, 라이코핀 함량이 매우 높은(대비종의 243%) 특성을 보여주고 있다. 또한 당 함량도 매우 높아 생식용 및 라이코핀 추출용 품종으로의 가능성이 높은 조합으로 선발하였다. 이 조합은 2012년도에 #506번으로 시험되었었는데 라이코핀 함량이 대비종보다 높아(대비종의 183%), 라이코핀 추출용 품종으로의 가능성이 높게 평가되었다.

(4) 유망품종 품종보호출원

2012년도와 2013년도의 시험에서 재배안정성이 우수하고 라이코핀 함량이 높고 과육특성도 우수한 품종으로 선발된 2개의 조합에 대해서는 품종보호 출원을 하였다.

(가) 리코후레쉬 1호(Lycofresh No.1)

#1511로 공시되어 라이코핀 함량이 높은 특성을 가진 조합으로 선발되어 리코후레쉬 1호로 명명하고 품종보호를 출원하였다(그림 76).

(나) 리코후레쉬 2호 (Lycofresh No.2)

#1512로 공시되어 라이코핀 함량이 높은 특성을 가진 조합으로 선발되어 리코후레쉬 2호로 명명하고 품종보호를 출원하였다(그림 77).


민원인을 가족같이, 민원을 내일같이	
통지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다. 담당자: 박수진 전화: (031) 467-0111 FAX: (031) 467-0116 인터넷 홈페이지: www.seed.go.kr 430-016 경기도 안양시 민원구 안양로 134	
품종보호출원번호 통지서	
출원일자: 2013. 1. 7	품종보호 출원번호: 출원 2013 - 23 품종명칭 출원번호: 명칭 2013 - 68
작 물 명 : 수박 품종 명칭 : 리코후레쉬1호 출 원 인 : 팍트너종묘 주 소 : 경기 안성시 미양면후평리 269-20	
2013년01월07일	
국 립 종 자 원 	

그림 76. 리코후레쉬 1호에 대한 품종 보호 출원 번호 통지서


민원인을 가족같이, 민원을 내일같이	
통지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다. 담당자: 박수진 전화: (031) 467-0111 FAX: (031) 467-0116 인터넷 홈페이지: www.seed.go.kr 430-016 경기도 안양시 민원구 안양로 134	
품종보호출원번호 통지서	
출원일자: 2013. 1. 7	품종보호 출원번호: 출원 2013 - 24 품종명칭 출원번호: 명칭 2013 - 69
작 물 명 : 수박 품종 명칭 : 리코후레쉬2호 출 원 인 : 팍트너종묘 주 소 : 경기 안성시 미양면후평리 269-20	
2013년01월07일	
국 립 종 자 원 	

그림 77. 리코후레쉬 2호에 대한 품종 보호 출원 번호 통지서

(5) 고탐량 라이코핀 품종 홍보

본 과제를 통해 선발된 품종과 조합의 상업적인 성공을 위해서 국내외에 많은 시교활동 및 홍보활동을 수행하였다.

(가) 시교 활동

본 연구과제를 통해 개발된 고탐량 라이코핀 조합은 고탐수박 신 성장동력산업 육성사업의 아이템으로 선정되어, 전북 고탐군 아산면 성산리 김태경 씨 하우스 포장에서 고탐량 라이코핀 수박의 생육특성 검정 및 라이코핀 함량 측정을 통한 고탐지역에 적합한 재배 체계 마련, 라이코핀 추출을 위한 수박 수매단가 문제의 해결방안을 위한 데이터 제공, 시범포를 통한 향토 산업 육성사업을 지역 주민들에게 홍보 및 동참 유도 등을 목적으로 시험 재배되었다. 고탐량 라이코핀 수박품종 시범포는 2011년 선발된 #503 조합을 접수로 하여 호박대목과 박대목을 활용하여 방입재배, 주간간격 45cm, 55cm에 따른 과중, 라이코핀 함량 특성 등을 조사하였다. 이 시험에서 호박대목을 이용해 55cm 주간간격으로 심은 시험구에서 수량이 가장 높게 나타났다(그림 78, 79).



그림 78. 시범포 전경



그림 79. 고탐량 라이코핀 수박 품평회(2012. 9. 26)

(나) 리코스위트 1호 등 고탐량 라이코핀 수박 품종 전시(안성연구소)

리코스위트 1호 등 본 과제를 통하여 개발되어 품종 보호 출원 중인 리코스위트 1호 등 고탐량 라이코핀 품종 등을 상업화하기 위해 2012년 7월 5일 파트너종묘의 안성연구소 시험포장에서 이마트 수박바이어 신현후 과장, 이마트에 수박을 유통하는 부안유통 임장섭 사장, 이서종묘 이광진 대표, 고탐 수박연구회 회원 등이 참석하여 리코스위트 1호 등 개발된 고탐량 라이코핀 품종을 평가하고 의견을 교환하는 자리를 가졌다(그림 80, 81).



그림 80. 전시된 품종의 상업화 가능성을 홍보하는 이서종묘 이광진 사장



그림 81. 고탐량 라이코핀 및 기타 기능성 품종의 공동 평가

(다) 리코스위트 1호의 전시회 출품

2012년 7월 6일 충북농업기술원 수박연구소에서 개최된 충북 수박 산학연 협력단 심포지엄 및 우수 수박 전시회에 출품품종으로 선발되어 리코스위트 1호 등 본 과제를 통해 개발된 우수품종의 전시회에 출품하여 호평을 받았다(그림 82, 83).



그림 82. 충북 수박 산학연 협력단 심포지엄 및 우수 수박 전시회



그림 83. 전시회에 우수품종으로 출품된 리코스위트 1호

(라) 해외 시험 사업

수출용 고품량 라이코핀 수박 개발을 위해 베트남의 Phusa Seeds와 공동으로 Mekong Delta지역인 Long An province에서 11월 16일 정식되어 1월12일 조사하였다. 이 시험에서 VA011로 수행된 리코후레쉬 2호가 육색이 진하고, 당도가 높고, 수량 및 상품과율에서 높은 평가를 받아 수출계약이 체결되어 수출물량을 확보하였으며, 2013년 8월에 20kg이 수출되었다(그림 84, 85).



그림 84. VA011(리코후레쉬 2호) 과일



그림 85. VA011(리코후레쉬 2호) 과육

(마) 해외 시교 공급

2012년도에 품종 보호 출원 된 ‘리코스위트 1호’, 금년에 선발되어 품종 보호 출원 된 ‘리코후레쉬 1호’, ‘리코후레쉬2호’는 파트너종묘가 확보한 해외협력회사들에게 시험용

종자를 공급하여 수출가능성을 타진하였다. 시교를 공급한 회사명, 국가 등은 표 38에 정리되어 있다.

표 38. 선발품종들의 시교공급 국가

품종명	국가	회사명	품종명	국가	회사명	품종명	국가	회사명
리코 스위트 1호	India	Ajeet Seed	리코 후레쉬 1호	China	DongBang Chia Tai	리코 후레쉬 2호	Malaysia	Chua
	India	Angel Seed		China	Hua Sheng		China	DongBang Chia Tai
	India	Indus Seed		India	Ajeet Seed		Japan	Kanda
	India	Mahyco		India	Mahyco		Japan	Tokita
	India	Nutechseed		Japan	Kanda		Korea	Phusa
	India	Panseed		Japan	Tokita		Netherlands	Axia Vegetable
	india	Solanacium		Netherlands	Axia Vegetable		Spain	Intersimillars
	Japan	Tokita		Spain	Intersimillars		Thailand	Limargrain
	Spain	Intersimillars		Thailand	Limargrain		Vietnam	Phusa
	Thailand	Limargrain		Vietnam	Phusa		말레이시아	Chua
	Korea	원에연구소		한국	함안기술센터		한국	한결씨드
	한국	한결씨드		한국	한결씨드			

(6) 4배체 유기 및 3배체 조합작성

라이코핀 함량은 이전 연구자들을 통해 밝혀진 바에 따르면 3배체 수박에서 가장 높은 것으로 알려져 있다. 라이코핀 함량이 높은 3배체 품종을 만들기 위해서 고품량 라이코핀 2배체 계통을 4배체로 자사가 확보하고 있는 유기방법에 의해 실시하였다. 4배체 유기는 태국 콘캔 농장에서 유기 작형과 건기 작형에 수행되었다(표 39, 40).

표 39. 유기작형에서 수행된 4배체 유기시험의 2배체 계통 특성

번호	과중	과형	과피색	라이코핀함량	유기개체수
3007	8kg	원형	호피	고	2
3009	4kg	원형	호피	고	1

유기 작형에서 대과종이면서 라이코핀 함량이 높은 #3007(그림 86)을 대상으로 4배체 유기시험을 수행하여 2개의 4배체 개체를 확보하였고, 중과종이면서 육질이 매우 단단한 #3009번(그림 87)에서 1개체의 4배체 개체를 확보하였다.



그림 86. 선발된 4배체 과(#3007)



그림 87. 선발된 4배체 과(#3009)

건기 작형에서는 6 계통의 고품량 라이코핀 계통에 대해서 4배체 유기시험이 실시되어 모든 계통에서 총 9 개체의 4배체 추정 개체를 선발하였다. 종자량이 많고 종자성상 및 과피 특성으로 보아 불확실한 일부 개체를 대상으로 자엽확인을 통해 4배체 유기 결과를 확인 중에 있다. 유기 및 건기 작형에서 확보된 4배체 추정 계통은 2013년도 한국 안성연구소에서 공시하여 재배시험을 통해 4배체여부를 최종적으로 확인할 예정이다.

표 40. 건기작형에서 수행된 4배체유기 시험의 2배체 계통특성

번호	과중	과형	과피색	라이코핀함량	유기개체수
4805	7kg	원형	호피	고	1
4806	7kg	원형	호피	고	2
4807	7kg	원형	호피	고	1
4813	8kg	원형	호피	고	2
4821	4kg	원형	호피	고	2
4822	4kg	원형	호피	고	1



그림 88. 선발된 4배체 과(#4805)



그림 89. 선발된 4배체 과(#4805)

마. 5차년도 고품량 라이코핀 조합 성능검정

(1) 안성연구소 조합 성능 검정 시험

안성시 미양면에 위치한 자사의 연구소에서 2013년 4월 5일에 정식하여 2013년 7월 6일에 수확하여 고품량 라이코핀 조합을 성능 검정하였다. 특성 및 시험성적은 표 41과 같다.

1001 : 대비품종으로 품종명은 '삼복꿀'로 라이코핀 함량은 25.5 μ g/mg이었다.

1012 : 중대과종 씨적은 수박으로 친구성은 고품량 × 저함량으로 라이코핀 함량은 체크품종과 큰 차이가 없었다.

1013 : 크림스타입 중대과종 씨적은 수박으로 친구성은 고품량 × 저함량으로 라이코핀 함량은 체크품종과 큰 차이가 없었다.

1014 : 흑피대과종 씨적은 수박으로 친구성은 고품량 × 저함량으로 당도가 높고, 비대력도 우수한 품종으로 라이코핀 함량은 체크품종과 큰 차이가 없었다.

1025 : 호피 중과종 수박으로 라이코핀 고품량 간의 조합으로 함량은 대비종에 비하여 55% 높았다.

1026 : 1025와 유사한 조합 구성으로 파이코핀 함량은 대비종에 비해 82% 높았다.

1027 : 1025와 유사한 조합 구성으로 라이코핀 함량은 대비종에 비해 91% 높은 특성을 보였다.

1028 : 고품량 계통 간의 조합으로 육색이 진하고 균일성이 우수한 중과종 품종으로 '리코후레쉬 1호'로 등록된 품종이다. 작년에 이어서 라이코핀 함량 및 품질이 우수하고 육색이 단단하여 매우 유망한 품종으로 재확인되었다(그림 90).

1029 : '리코후레쉬 2호'로 등록된 품종으로 육색이 진하고, 품질이 우수하며, 당도가 높은 품종으로 올해 베트남에 수출을 시작한 유망한 품종이다. 라이코핀 함량은 대비품종에 비해 77% 높았다(그림 91).

1030 : 중과종 호피 원형 품종으로 라이코핀 함량이 대비종에 비해 61% 높은 것으로 나타났다.

1031 : 단타원형 호피 원형 품종으로 육색이 진하고, 특히, 고당도 품종으로 라이코핀 함량도 대비종에 비해 두 배 이상(222%) 높아 매우 유망한 조합으로 선발되었다(그림 92).

1032 : '리코스위트 1호'로 등록된 품종으로 올해시험에서도 라이코핀 함량이 매우 높게(245%) 나타나 라이코핀 추출용 등 가공용 품종으로의 활용도도 매우 높은 것으로 재확인되었다. 2년에 걸친 재배시험결과 균일성, 안정성, 구별성이 인정되어 품종보호권(제4887호)을 획득하였다.

1033 : 고품량 계통 간의 조합으로 라이코핀 함량이 대비종에 비해 60% 높게 나타났다.

1036 : 크림슨 단타원형 품종이며, 중과종으로 당도 등이 우수하였고, 라이코핀 함량도 높게 나타나 수출용수박으로 유망한 것으로 판단되었다.

1037 : 크림슨 단타원형 품종으로 라이코핀 함량이 높고, 품질이 우수하여, 수출용으로 유망하다.

1038 : 올해 시험에서 가장 높은 라이코핀 함량을 보여주었고(260%) 품질도 양호하여 생식용 및 가공용으로 유망한 것으로 판단된다.

1039 : 흑피고당도 품종으로 품질이 우수하고 라이코핀 함량도 매우 높아(255%) 유망한 품종으로 판단된다(그림 93).



그림 90. 1028(리코후레쉬 1호)의 과육 및 외관



그림 91. 1029(리코후레쉬 2호)의 과육 및 외관



그림 92. 1031(라이코핀 함량과 당도가 매우 높음)의 과육 및 외관



그림 93. 1039(라이코핀 함량이 매우 높음)의 과육 및 외관

표 41 라이코펜 조합 특성 및 라이코펜 함량

품종	조합구성	과형	과피색	과중(kg)	당도(Brix)	과형균일 ^Z	육색 ^Y	숙기 ^X	라이코펜 함량($\mu\text{g}/\text{mg}$)	라이코펜 함량비 (대비종 대비, %)
1001	삼복꽃	단타원형	호피	7.3	11.9	6	5	5	25.5	100
1012	고함량 × 저함량	원형	호피	8.3	13.2	7	7	6	21.6	85
1013	고함량 × 저함량	원형	크림슨	8.4	13.2	7	6	6	15.3	60
1014	고함량 × 저함량	원형	흑피	9.2	13.7	7	6	6	28.6	112
1025	고함량 × 고함량	단타원형	호피	5.9	12.5	7	7	7	39.5	155
1026	고함량 × 고함량	단타원형	호피	5.2	13.3	7	8	7	46.5	182
1027	고함량 × 고함량	단타원형	흑피	5.6	13.3	7	8	7	48.8	191
1028	고함량 × 고함량	원형	흑피	6.8	12.5	7	8	7	52.4	205
1029	저함량 × 고함량	원형	호피	6.4	13.7	7	7	7	45.1	177
1030	고함량 × 저함량	원형	호피	5.4	13.4	7	6	7	41.1	161
1031	고함량 × 저함량	단타원형	호피	6.3	14	4	7	7	56.7	222
1032	고함량 × 고함량	단타원형	흑피	5.1	12.4	4	8	7	62.5	245
1033	고함량 × 고함량	단타원형	흑피	7.1	12.3	4	6	6	40.8	160
1036	고함량 × 저함량	단타원형	크림슨	5.5	13.5	6	6	7	34.5	135
1037	고함량 × 고함량	단타원형	크림슨	5.2	12.7	6	6	7	41.6	163
1038	고함량 × 고함량	단타원형	크림슨	5.5	12.7	5	7	8	66.2	260
1039	고함량 × 고함량	단타원형	흑피	6.1	13.2	5	7	7	64.9	255

Z: 숫자가 높을수록 균일도 우수, Y: 숫자가 높을수록 진한 적육색, X: 숫자가 높을수록 숙기가 빠름, W: 숫자가 높을수록 저장성이 우수

바. 품종보호 등록

(1) 리코스위트 1호

라이코핀 함량이 매우 높고 당도가 우수한 리코스위트 1호가 품종 보호 출원(2011년 11월 24일)되어 품종보호권이 등록(2014년 3월 20일, 제4887호)되었다(그림 94).



그림 94. 리코스위트 1호 품종보호권등록증



그림 95. Sweet Bambino

사. 고품량 라이코핀 품종 종자 수출

본 과제를 통해서 개발된 리코후레쉬 2호는 베트남에 2013년 8월 31일 3,000US\$ 수출되어 베트남에서 'Sweet Bambino'로 등록되어 판매되고 있다(그림 95).

아. 산업화방안

본 과제를 통해서 개발된 품종들은 현재 일본, 중국 등지에서 시험재배를 진행하고 있으며 한국에서도 시교재배가 진행되고 있어서 시험결과에 따라서 해외종자수출, 국내산업화 등을 추진할 계획이다.

6. 열대 세대진전 시험 시스템 확립

가. 1차년도 태국 세대진전 시험 수행

고함량 라이코핀 특성을 최대한 단기간 내에 도입하기 위해서는 여교잡 방법이 가장 적당할

것으로 판단되며, 세대를 빨리 진행시키기 위해서는 한국에서 재배 및 선발이 어려운 시기인 겨울철에 재배가 가능한 지역에서 세대를 진전시키는 것이 필수적이다. 이를 위해서 가장 적절한 세대진전지를 선택하기 위해 온도, 강우, 일장, 토양 등 자연적 조건, 인건비, 지가 등 경제적 조건, 도로, 통신망 등 사회기반시설, 접근의 용이성뿐만 아니라 사회질서와 문화수준 또한 고려사항이었다. 이러한 조건을 가장 잘 충족시키는 지역은 아시아 열대지역 중에서 태국이 가장 좋을 것으로 판단되었으며, 태국은 이러한 조건들에 적합하기 때문에 오래전부터 한국 주요 종자회사들의 채종지로 이용되어 왔다. 태국은 한국에서 재배가 어려운 겨울철인 10월부터 2월에는 주간온도 30.0℃ ~ 32.8℃, 야간온도 17.8℃ ~ 22.2℃ 정도로 박과작물 재배에 적합한 온도조건을 보여주고 있고(표 42), 건기시기이기 때문에 비가 오지 않아 이 시기가 종자생산에 매우 적합한 시기이므로 태국은 세대전전에 매우 적합한 지역으로 판단되고 기타 기반시설, 문화수준 등도 만족할 만한 수준으로 세대진전 사업을 운영하기에 충분한 조건을 갖추었다. 태국 중에서도 동북지역에 위치한 Khonkaen시에는(그림 96) 생산경험이 풍부한 많은 생산회사들이 자리하고 있어서 세대진전 사업을 위탁할 수 있는 생산전문회사들과 접촉하여 그 중에 Hsin Seed라는 회사에 재배를 의뢰하는 방법으로 세대진전을 수행하였다.



그림 96. 세대진전사업을 수행한 Khonkaen역의 위치(등근 원).

표 42. Khonkaen지역의 월별 평균기온(℃), 최고기온(℃), 최저기온(℃), 강우일수.

Climate	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Avg. Temp.	24.4	25.6	28.3	29.4	28.9	28.3	27.8	27.8	26.7	26.7	25.0	23.3
Avg. Max. Temp.	31.7	32.8	35.0	35.6	33.9	33.3	32.2	32.2	31.7	31.7	31.1	30.0
Avg. Min. Temp.	17.8	19.4	22.2	23.9	24.4	24.4	24.4	23.9	23.3	22.2	20.0	17.8
Avg. Rain Days	0	1	3	4	7	8	9	9	7	5	2	0

세대진전을 위하여 2009년 10월 15일에 태국으로 파종용 종자를 발송하여 10월 23일 파종, 11월 5일 정식, 12월 2일 - 9일에 교배하였으며 2010년 1월 9 ~ 12일에 수확하였다. 파종은 54공 트레이에 피트모스를 충전하여 직파한 후(그림 97) 13일 후에 노지포장에 정식하였다. 재배포장은 사질포장으로 배수가 잘 되는 특성을 지녔고, 재배를 위하여 포장에 적정량의 화학비료, 석회 등을 시용하였고 점적호스를 설치한 후 비닐 멀칭을 하였다(그림 98). 이량은 3m, 정식간

격은 50cm로 하여 정식일에 오후 2시부터 정식을 실시한 후(그림 99) 점적관수와 고랑관수를 병행하여 재배하였다. 이후 재배는 태국의 수박재배 관행에 맞추어 재배를 하였다. 정식 후 27일째 되는 날부터 인공교배를 통하여 self pollination과 cross pollination을 실시하였다. 이른 오전에 실시하였다(그림 100, 그림 101). 교배를 위하여 개화 전일 오후에 자화와 옹화를 plastic cap으로 씌워 곤충의 접근을 차단한 후 오전 7시부터 교배를 시작하여 9시 정도에 교배를 완료하였으며 교배 후 피봉을 하였다. 교배 후 38째부터 숙기에 따라 수확을 하였다(그림 102, 그림 103). 수확 시 과육 특성 등에 따라 선발하고 선발되어진 과에서 종자와 과육을 채취하여 40시간 정도 후숙한 후(그림 104) 종자를 수확하였으며 수확된 종자는 소독을 위하여 1.25% Tsunami 용액에 15분 동안 침지처리한 후 3일 정도 자연 건조하였다. 건조된 종자는 한국으로 즉시 발송되어 1월 26일 자사에 도착하였다. 과중용 종자 발송에서부터 수확된 종자의 수령까지 총 102일이 소요되었으며 재배과정 상에 바이러스 증상을 보이는 개체가 일부 보여 제거하였고, 그 외에는 재배에 영향을 미칠 수 있는 심각한 문제들은 발생하지 않아 세대진전은 매우 성공적으로 진행되어 한국 뿐 아니라 겨울철에 태국을 활용하여 육성사업을 실시하는 것은 육성 효율 증진에 매우 효과적인 것으로 판단된다.



그림 97. 태국 건기 작형에서 육묘용 트레이 과중



그림 98. 정식전 포장 전경.



그림 99. 정식 후 포장 전경.



그림 100. 교배가 진행 중인 포장 전경.



그림 101. 착과된 과일 모습.



그림 102. 수확 조사 중 포장 전경 I.



그림 103. 수확 조사 중 포장 전경 II.



그림 104. 채종 후 후숙 중인 종자.

나. 2차년도 태국 세대진전 시험 수행

신품종의 life cycle이 점차 짧아지고, 소비자의 품종에 대한 기호도도 매우 빨리 변하므로 이에 따라 신품종의 육성개발기간도 단축할 필요성이 대두되고 있고 그 하나의 대안으로 해외시험포를 활용한 세대진전이 부각되고 있다. 2010년도에도 2009년도와 마찬가지로 고품량 라이코핀 관련하여 세대진전, 조합작성, 증식 및 시교생산을 위하여 태국 Khonkaen지역에서 세대진전을 실시하였다(표 43, 그림 105, 106).

표 43. 태국 세대진전 시험포 재배 경종개요

지역	파종	정식	교배	수확 및 조사	시험규모
Khonkaen	2010. 10. 29.	2010. 11. 14	2010. 12. 14~23	2011. 1. 17~31	1800주



그림 105 태국 Khonkaen지역에서 수행된 세대진전 시험포 전경



그림 106. 세대진전 시험포의 작황을 개선하기 위해 도입하고 있는 부직포 피복 방법

시험은 2010년 10월 20일 태국으로 종자를 발송하여 10월 29일 파종하였으며, 11월 14일 정식하여 12월 14일부터 23일까지 인공교배를 실시하였다. 당해 연도에는 예년과는 다르게 해충의 밀도가 증대하여 바이러스 감염주가 다수 발생하였으며 개체 간, 계통 간의 생육 불균일이 심하였다. 이에 따라 교배기간이 예년의 6일 정도에서 10일 정도로 길어졌고, 시험포장내의 착과일자도 많은 편차를 보여주었고 이에 따라 수확 및 조사기간도 길어졌다. 본 열대시험포운영을 통하여 세대진전 및 증식, 라이코핀 계통 선발 등을 위하여 143점의 자가 수정된 종자로트를 확보할 수 있었으며 특성검정용 교배조합작성, 시교생산, 라이코핀 특성 도입을 위한 63점의 타가 수정된 종자로트가 수확되었다.

다. 3차년도 태국 세대진전 시험 수행

(1) 태국 여름 작형

태국 여름 작형은 2월 중하순에 파종하여 3월 초 정식, 4월 초 교배하여, 5월 중순에 수확하는 작형으로, 교배시기에 매우 온도가 높고, 건조하며, 일반적으로 충해의 발생과 그로 인한 바이러스이 감염이 많은 작형이다(표 42). 이 작기는 태국의 전통 설명절인 송클란이 4월 12일부터 약 4 ~ 5일간 지속되는 작형으로 이 시기에는 인력수급에 문제가 많으므로, 이 기간에 노동력이 많이 소요되는 교배기를 피하는 작부체계의 수립이 필수적이다. 전작기인 건기 작형에서 바이러스의 피해가 심했으므로 여름 작형에서는 해충으로 인한 바이러스 감염을 막기 위해 정식 직 후 얇은 부직포를 약 20일 간 덮어 해충의 비래를 방지하였으며, 해충의 밀도를 낮추기 위해 포충판을 설치하였다(그림 107). 이러한 작업이 매우 효과적이어서 바이러스의 피해를 획기적으로 줄일 수 있었고, 작황이 매우 좋아서 질적 형질에 대한 선발, 단순한 세대진전, 교배조합 작성 등이 원활히 수행될 수 있었다. 하지만 이로 인한 비용 상승 부담이 있어서 조금 더 단순하고 효율적인 부직포 설치방법을 고안할 필요가 있다.



그림 107. 여름작형에 도입한 부직포 및 포충판



그림 108. 우기작형 수확 모습

(2) 태국 우기 작형

태국 우기 작형은 5월 중하순에 파종하여 6월 중순 정식, 7월 중순 교배하여 8월 중,하순에 수확하는 작형으로(표 42), 재배초기에는 일주일에 한 차례정도, 재배후기에는 일주일에 두 차례 정도 열대성 스콜이 내리므로 매우 다습한 환경에서 재배가 이루어진다. 강한 비가 내릴 경우에는 앞에 구멍 등 상처가 날 정도로 잎 손상이 강하고 특히 과부담으로 식물체가 약해지는 재배 후기에는 만고병 등의 병 발생이 비교적 심해 재배하기가 까다로운 작형이지만 올해에 특히 잦은 강우에도 불구하고 비교적 재배작황이 좋아서 세대진전 및 교배 조합 작성을 원활히 수행할 수 있었다(그림 108).

(3) 태국 건기 작형

태국 건기 작형은 10월 중하순에 파종하여 11월 초 정식, 12월 초 교배하여 1월 중순에 수확하는 작형으로, 건조하고 상대적으로 기온이 서늘하여 재배하기가 가장 무난한 시기이고, 또 한국육성프로그램의 겨울철 세대진전 작형으로 가장 적합한 작형이다(표 42). 이 시기에는 해충의 비래로 인한 바이러스 감염이 자주 나타나는 작형이다. 이 작형의 어려움은 태국의 벼 수확시기인 11월 중순 ~ 12월 중순까지 노동력확보에 많은 어려움이 있는 작형이므로 이 시기에 노동력이 집중되는 교배 작업 등이 진행되지 않도록 재배시기를 조절할 필요가 있다(그림 109).



그림 109. 건기작형 재배포장 전경

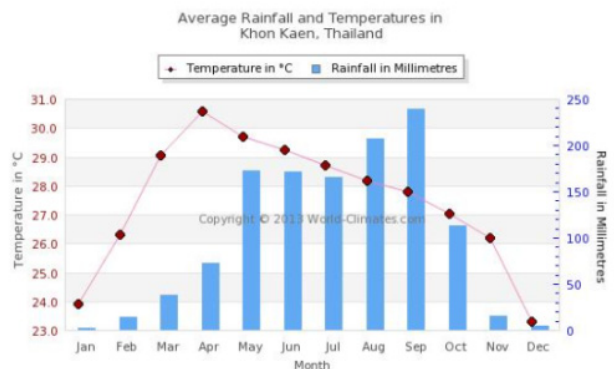


그림 110. 세대진전을 수행 중인 Khonkaen 지역의 연평균 기온 및 강수량

라. 태국에서의 세대진전 시스템

(1) 태국 여름 작형

작형은 2월 중하순에 파종하여 3월 초 정식, 4월 초 교배하여, 5월 중순에 수확하는 작형으로, 교배시기에 매우 온도가 높고 건조하고 일반적으로 충해의 발생과 그로 인한 바이러스이 감염이 많은 작형이다. 이 작기는 태국의 전통 설명절인 송클란이 4월 12일부터 약 4 ~ 5일간 지속되는 작형이므로, 이 시기에는 인력수급에 문제가 많으므로 이 기간에 노동력이 많이 소요되는 교배기를 피하는 작부체계의 수립이 필수적이다. 또한 교배기의 지나친 고온으로 인해 착과율이 낮고 착과기간이 길어지는 문제가 발생할 수 있으므로 교배기간은 3월 중 ~ 4월 초, 또는 4월 하순 이후로 작부체계를 조정하는 것이 필요하다. 특히 여름 작형에서는 착과율이 떨어지는 4배체 유기 및 증식 등은 피해야 한다(그림 111).



그림 111. 태국여름작형의 수확기 포장 전경

(2) 태국 우기 작형

태국 우기 작형은 5월 중 하순에 파종하여 6월 중순 정식, 7월 중순 교배하여 8월 중, 하순에 수확하는 작형으로, 재배초기에는 일주일에 한 차례정도, 재배 후기에는 일주일에 두 차례정도 열대성 스킨이 내리므로 매우 다습한 환경에서 재배가 이루어진다. 강한 비가 내릴 경우에는 잎에 구멍 등 상처가 날 정도로 잎 손상이 강하고 특히 과부담으로 식물체가 약해지는 재배후기에는 만고병 등의 병발생이 비교적 심해 재배하기가 까다로운 작형이다. 비가 특히 많이 오는 시기인 9월 이전에 수확하는 작형으로 시험을 수행해야 안전한 세대진전 및 조합작성을 수행할 수 있다. 우기 작형에서 특히 정식초기에 스킨로 인한 잎의 손상 등이 초래될 수 있으므로 부직포 피복(그림 112) 등의 작업이 필요하다. 9월 이전에 수확하는 작형으로 재배한다면, 2배체 세대진전, 증식 뿐 아니라 4배체 유기 및 증식, 3배체 생산도 무난히 수행될 수 있는 시기이다.



그림 112. 우기작형의 정식후 부직포 피복

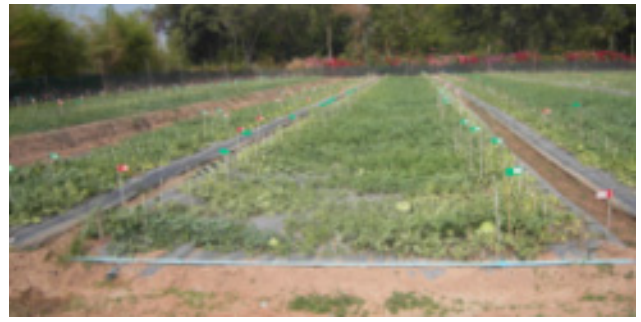


그림 113. 건기작형 재배포장 전경

(3) 태국 건기 작형

태국 건기 작형은 10월 중 하순에 파종하여 11월 초 정식, 12월 초 교배하여 1월 중순에 수확하는 작형으로, 건조하고 상대적으로 기온이 서늘하여 재배하기가 가장 무난한 시기이고, 또 한국육성프로그램의 겨울철 세대진전 작형으로 가장 적합한 작형이다. 이 시기에는 해충의 비래로 인한 바이러스 감염이 자주 나타나는 작형이다. 이 작형의 어려움은 태국의 벼 수확시기인 11월 중순 ~ 12월 중순까지 노동력확보에 많은 어려움이 있는 작형이므로 이 시기에 노동력이 집중되는 교배 작업 등이 진행되지 않도록 재배시기를 조절할 필요가 있다(그림 113).

7. 효과적인 품종개발 시스템 제안

가. MAS + 열대 세대 진전 시험

(1) 1년차 : 목표 형질과 목표 품종을 정하고, 태국 건기 작형(10월 파종)에서 모계, 부계 계통에 목표 형질을 가진 계통과 교배하여 F1을 확보한다. 여름 작형에서 BC1F1을 작성하고, 우기 작형에서 MAS를 수행하여 목표형질을 가지면서 원예적 형질이 반복친과 최대한 유사한 개체를 선발하여 BC2F1을 작성한다.

(2) 2년차 : 태국 건기 작형에서 BC2F1집단을 전개하여 MAS를 수행하여 개체선발 후 BC3F1을 작성하고 여름 작형에서 MAS와 원예적 형질을 조사하여 반복친과 최대한 유사한 개체를 선발하여 BC4F1을 작성한 후 이어진 우기 작형에서 BC4F2를 작성한다.

(3) 3년차 : 태국 건기 작형에서 BC4F2를 전개하여 MAS를 통해 목표형질이 homozygous 한 개체들을 선발하여 자식종자를 수확하여 원원종을 확보하고 동시에 시교생산을 수행한다. 확보된 시교종자는 이어지는 한국의 봄 작형(2월 파종)에서 시교 재배, 특성 조사, 품종 등록을 실시한다. 이러한 시스템을 통하여 24개월 안에 목표형질을 가진 여교잡품종을 개발할 수 있는 시스템(그림 121)을 제안한다.

나. MAS + MAB + 열대세대진전 시험

(1) 1년차 : 목표 형질과 목표 품종을 정하고, 태국 우기 작형(6월 파종)에서 모계, 부계 계통에 목표형질을 가진 계통과 교배하여 F1을 확보한다. 건기 작형에서 BC1F1을 작성하고, 여름 작형에서 MAS를 수행하여 목표형질을 가진 개체들을 선발(약 300개체)하고 이 개체에 대하여 MAB를 수행하여 유전형이 반복친과 87.5% 이상 가까운 개체를 선발하여 BC2F1을 작성한다(그림 114).

(2) 2년차 : 태국 우기 작형에서 BC2F1집단을 전개하여 MAS + MAS를 통해 목표형질을 가지면서 반복친과 98% 이상으로 유전형이 가까운 개체를 선발하여 BC2F2를 작성한다. 이어지는 태국 건기 작형에서 BC2F2를 전개하여 MAS를 통해 목표형질이 homozygous한 개체들을 선발하여 자식종자를 수확하여 원원종을 확보하고 동시에 시교생산을 수행한다. 확보된 시교종자는 이어지는 한국의 봄 작형(2월)에서 시교재배, 특성조사, 품종등록을 실시한다. 이러한 시스템을 통하여 16개월 안에 목표형질을 가진 여교잡품종을 개발할 수 있는 시스템(그림 115)을 제안한다.



그림 114. MAS와 열대세대진전을 활용한 효율적인 품종개발시스템 (24개월)



그림 115. MAS+MAB와 열대세대진전을 활용한 효율적인 품종개발시스템 (16개월)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	관련분야에의 기여 (자세평가)	달성도(%)				
				1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도 (2012)	5차년도 (2013)
1-1 세 부	벼 당질배유 유전자 발굴 및 분자마커 개발	유전자 분리를 위한 후보 유전자 발굴, 마커 개발	당질배유 돌연변이체 su2의 유전 분석을 통해, <i>isoamylase</i> 와 또 다른 진분 합성 관여 유전자인 <i>1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2</i> 가 상위 작용을 하여 su2 표현형을 결정한다는 것을 밝혔다. 형질전환을 통해 각 유전자의 기능을 확인 했고 들의 진분 생합성 과정에의 상호 작용을 밝혀 논문에 발표할 예정.	15	30	45	60	95
	식미 관련 분자표지이 P5 연관 유전자 발굴	고식미 특이적 염기서열의 확인 여부	고식미 품종 특이적 염기서열 및 위치 파악, 해당 염기서열의 기능을 확인, 특허적 염기서열의 유래 파악, 이 원료됨으로 향후 식미에 관련된 새로운 유전자를 발굴할 가능성이 높고 이를 이용해서 고식미 품종 육종에 큰 도움을 줄 것임.			30	50	90
	저단백 staygreen 계통 벼 육성	계통 육성 여부	고식미 계통으로서 추후 품종 개발의 재료로 활용 가능성	20	40	60	80	100
	식미 판별 마커 추가 개발, 개량 및 검증	마커 개발 및 개량과 검증 여부	새로운 식미 마커 세트를 인디카와 자포니카 type 모두에서 개발 하였고, 논문을 작성하고 실제 지원서비스에 적용함. 식미마커 세트를 계속해서 추가 하고 개량해 감으로 식미분야에 있어서 독보적인 기술력 확보.	20	40	50	90	110
작물 분자 마커 지원서비스	목표 달성 여부, 민간 육종 분야와의 소통	목표 달성했으며, 지원서비스 시스템을 최초로 마련하여 민간에 지원하였음.	10	23	30	67	103	

	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	관련분야에의 기여 (자체평가)	달성도(%)				
				1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도 (2012)	5차년도 (2013)
	분자마커 활용 워크숍	개최 여부 및 내용	분자마커에 대한 민간의 이해도를 한단계 향상 시켜 분자유종의 저변을 확대함.	20	40	60	80	100
	쌀, 현미, 유색미 등의 곡류에서 미량생리활성물질인 GABA등의 미량분석기술 확립	GABA의 분석기술 확립	EZ:Faast kit를 이용한 GABA 분석기술 확립하여 목표 달성	100				
	콩 등으로부터 항산화물질 isoflavone, anthocyanin 신속, 간편 분석법 개발	Isoflavone, anthocyanin의 분석기술 확립	타 기관에서 제공되지 않는 Isoflavone(7종), anthocyanin(7종) 다성분 동시 분석기술 확립하여 목표 달성	100				
	배추와 고추 등의 엽채류 채소의 기능성성분 glucosinolates, 당류 분석법 확립	Glucosinolates, 당류 분석법 확립	UHPLC-MS를 이용한 glucosinolates(11종) 동시분석법 확립, LC-ELSD를 이용한 당류(5종) 동시분석법 확립하여 목표 달성			100		
1-2	포도의 항암/항산화성분인 resveratrol과 유기산 성분의 신속분석기술 개발	Resveratrol과 유기산 분석법 확립	LC-MS를 이용한 resveratrol 분석법 확립, 유기산(7종) 동시분석기술 확립하여 목표 달성				100	
	인삼, 가시오가피 등의 특작류의 기능성물질(ginsenosides, eleutherosides) 분석기술 개선	Ginsenosides와 eleutherosides 분석법 확립	Ginsenosides(15종), eleutherosides(2종) 동시분석기술 확립하여 목표 달성					100
	생화학 성분 분석 지원 서비스	확립된 분석법을 서비스 제공	민간유종가와 종자회사에 다양한 작물별 생화학 성분 분석 서비스(총 7,441점)를 제공함	20	40	60	80	100
목표	수박, 호박 등의 lycopene, β-carotene 분석법 확립	Lycopene, β-carotene 분석법 확립	Lycopene, β-carotene 동시분석법 확립하여 목표 추가 달성	100				
외	고추의 capsaicin, dihydrocapsaicin 분석법 확립	Capsaicin, dihydrocapsaicin 분석법 확립	Capsiate, dihydrocapsiate를 포함한 capsaicinoids(4종) 동시분석법 확립하여 목표	100				

	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	관련분야에의 기여 (자체평가)	달성도(%)					
				1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도 (2012)	5차년도 (2013)	
1-3 세 부	성 과	파프리카의 apigenin-7-gluco- sides 성분 분석법 확립	Apigenin-7-gluco- sides 분석법 확립	추가 달성					
				타 기관에서 제공되지 않는 apigenin-7-gluco- sides 성분 분석법 확립하여 목표 추가 달성	100				
	고추 분자표지 분석 지원 서비스	양파의 quercetin 성분 분석법 확립	Quercetin 분석법 확립	Quercetin 분석법 확립하여 목표 추가 달성	100				
				평균 40% 추가 달성. 국내의 고추육종 효율 및 대외 경쟁력 향상	45	78	107	140	
	고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자 판별 마커 세트 개발특허등록	고추 분자표지 multiplexing 기술 개발	분자표지를 개발 여부	성공적으로 개발함. 고추의 TMV 저항성 분자육종 효율 향상	50	80	100		
				성공적으로 개발함. 역병과 Rf 동시 검정을 위한 마커분석 효율 향상			50	100	
	고추 육종 성과	기 개발된 고추 마커를 HRM 마커로 전환	분자표지를 개발 여부	성공적으로 개발함, 주요 서비스 마커의 분석 속도 개선으로 분자육종 효율 향상 및 서비스 경쟁력 확보				100	
				매운맛 높이는 유전자연관 분자표지 후보 개발 및 매운맛 함량 높이는 유전자 유전분석 수행 완료함. 이와 관련해 두 성분에 대한 연관 분자마커개발 기반 마련	20	40	60	80	90
	2-1 세 부	고려인삼 품종구분 마커 개발 및 실용화	일정 수 이상의 마커 개발 여부, 품종구분 가능 여부	SSR 마커 다수 확보하여 인삼 품종 구분에 기여함. 인삼의 모든 상용품종 구분 가능함.	35	70	100		120
				품종구분 마커를 이용한 인삼 육종 및 종자보급체계지원 여부	30	60	100		

	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	관련분야에의 기여 (자체평가)	달성도(%)				
				1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도 (2012)	5차년도 (2013)
2-2 세 부	중 구분 마커를 활용한 상용 인삼 가공 제품의 기원 및 재료 혼입 관별의 실용화	인삼가공 제품의 품종 혼입 관별 여부	시판되는 인삼 가공 제품에 고려인삼외의 외국품종 혼입여부 확인 가능함.		20	80	100	120
	오가과 약용식물 자원의 성분 및 DNA 마커 활용 분류체계 정립	오가과 약용식물의 분류 가능한 마커 개발 여부	오가과 약용작물들의 분류 가능한 마커 개발		20	40	100	120
	벼의 저장단백질 함량 조절 및 식미조절 마커 단백질 동정	저장단백질 안정성과 발현 조절에 관여하는 PDI, BIP, REB 단백질에 대한 항체 제작, 단백질체학을 통한 새로운 식미조절 마커 단백질 동정	단백질체학 방법으로 PDI 돌연변이체를 선별하고 PDI에 의해서 함량이 조절되는 저장단백질 동정. PDI와 BIP 단백질에 의해서 함량이 조절되는 단백질 분리.	35	60	80		
	배추 기능성 품종육성을 위한 계통육성 및 분자유종 연구	카로티노이드 생합성 대사과정에 관여하는 유전자 탐색 및 염기서열 정보수집 및 STS 분자마커 개발 여부. 배추 우수계통 선발여부.	유전자 탐색 및 분자 마커 개발 완료함. 우수 계통 선발함.			30	60	100
	콩 종실 phytate함량 관련 마커 개발 및 적용	다수성 콩 계통에 저 피트산염을 가진 우량계통 육성을 위한 분리집단 양성	저 피트산염 분리집단의 세대진전 및 종자확보	20	30	40	60	90
	지부배추 유묘기 건조 스트레스 처리 및 저항성 유전자 선발	지부배추 유묘에 건조처리 후 잎 단백질 추출 및 이에 대한 질량 분석기를 활용한 shotgun proteomics 분석 여부. 단백질체 분석으로 건조과정 중 특이 발현하는 단백질을 찾고 이를 코딩 하는 유전자 리스트 제시 여부.	지부배추 유묘에 건조처리 후 잎단백질 추출했고, 1D-SDS PAGE 분석했음. 모든 시료에 대하여 shotgun proteomic 분석 완료. 단백질체 동정완료. 동정된 단백질 발현량을 비교하여 특이 발현하는 단백질 동정했고 이들 단백질의 기능에 대한 BLAST 및 annotation 에 대한검토를 진행 중이며 건조저항성 관련 유전자 정보를 일부				100	

세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	관련분야에의 기여 (자체평가)	달성도(%)				
			1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도 (2012)	5차년도 (2013)
지부배추 유묘기 고온 스트레스 처리 및 저항성 유전자 선발	지부배추 유묘에 건조처리 후 잎 단백질 추출 및 단백질에 대하여 질량분석기를 활용한 shotgun proteomics 분석 여부. 단백질체 분석 및 관련 유전자 제시 여부.	제공(건조 저항성 관여 가능성을 제시). 지부배추 유묘에 건조처리 후 잎 단백질 추출했고, 1D-SDS PAGE 분석했음. 모든 시료에 대하여 shotgun proteomic 분석 완료. 단백질체 동정완료. 추후 고온 저항성 관련 유전자 정보를 확보 할 수 있으며 다양한 작물의 고온 저항성 연구에 활용 할 수 있음.					90
고함량 라이코펜 수박 유전자원 탐색	수집 유전자원의 라이코펜 함량 및 유용성	고함량 라이코펜 품종개발을 위한 유용한 유전자원이 확보됨	80	100	100	100	100
고함량 라이코펜 수박 계통 개발	개발된 계통의 원예적 형질 및 라이코펜 함량	기존계통대비 약 1.5~3배의 고함량 계통이 개발됨	20	40	70	100	120
라이코펜 마커 개발용 수박 집단 양성	양성된 집단의 유용성	4세트의 저함량 및 고함량 NILs 확보	20	40	80	120	140
수박 고함량 라이코펜 분자마커 개발	개발된 분자마커의 활용성	연관이 매우 높은 분자마커를 확보 중에 있으며 향후 이를 통해 고 기능성 수박 품종 육성에 상용될 예정.	20	40	60	70	90
고함량 라이코펜 수박 품종개발	개발된 품종의 원예적 형질 및 수준	우수한 특성을 지닌 4품종의 고함량 라이코펜 품종이 개발되었고, 일부 품종은 수출됨	20	40	100	150	200
수박 열대 세대 진전 시험 시스템 확립	태국에서의 안정적인 연 3회 세대진전가능여부	안정적인 연 3회 세대진전 시험 시스템을 확립	20	50	80	120	140

2-3
세
부

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과 총괄표

(단위: 건수)

구 분		목 표	성 과	비 고	
(1)	분자마커 지원서비스	79,000 점	99,295 점	- 25개 기관 이용 - 4개작물, 16종 마커	
(2)	성분 분석 지원서비스	7,000 점	7,441점	- 20개 기관 이용 - 24개 작물, 21종 성분	
(3)	분자 마커 개발		10종 188점		
(4)	성분 분석 기술 확립		92개 성분	- 29개 작물, - 다 성분 동시 분석 기술 포함	
(5)	특허 출원	11	5	- 국내 5건, 국외0건	
(6)	특허 등록	11	3	- 국내 3건, 국외0건	
(7)	품종 보호 출원	3	4		
(8)	품종 보호 등록	1	2		
(9)	품종 명칭 등록	2	4		
(10)	유전자원 등록	15	-		
(11)	기술거래	4	-		
(12)	사업화	-	1		
(13)	상품화	7	4		
(14)	수출 계약	-	1		
(15)	수출관련 인증	-	-		
(16)	농기계 및 농자재 인증	-	-		
(17)	국제화 협력 성과	-	-		
(18)	연구 거점 확보	-	1		
(19)	논문	SCI	28	8	
		비SCI	5	4	
(20)	학술 발표	국내	-	30	- 구두 5건, 포스터 25건
		국외	-	9	- 구두 1건, 포스터 8건
(21)	교육 지도	9	8		
(22)	정책 활용	-	-		
(23)	타 연구에 활용	-	2		
(24)	전시회	-	4		
(25)	저작물	-	7		
(26)	매뉴얼	-	1	- 성분분석법 SOP	
(27)	인력양성	-	11		
(28)	장단기 연수 지원		2		
(29)	언론 홍보	7	2		
(30)	기타 홍보실적(수상실적)	-	1		
(31)	설문조사	-	6		
(32)	행사 개최(심포지엄 등)	-	5		

(1) 분자마커 지원서비스

(가) 분자마커 지원 서비스 현황 (2009년4월10~ 2014년 4월9일)

작물	마커 종류	분석 수량(점)					합 계
		1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도 (2012)	5차년도 (2013)	
벼	도열병		2,370				2,370
	품종 순도		500			597	1,097
	식미				8,064	7,242	15,306
고추	역병저항성	5,076	6,349	9,853	6,113	8,863	36,254
	CGMS	2,271	1,994	2,840	2,656	4,613	14,374
	GMS(ms1, ms3, Gmsk)	2,081	2,754	3,101	5,545	1,779	15,260
	TMV 저항성	594	248	143		599	1,584
	CMV 저항성	280	84	343	60	1,130	1,897
	매운맛	389	55	442	882	0	1,768
	Potyvirus 저항성	300	561	225	30	18	1,134
	탄저병저항성		746	718	790	1,034	3,288
	세균성점무늬병 저항성					11	11
	순도검정		516	433		94	1,043
인삼	품종구분	2,184					2,184
	품종 순도			1,690			1,690
수박	과육색구별		35				35
합 계		13,175	16,212	19,788	24,151	25,969	99,295

(나) 분자마커 지원 서비스를 통한 효과

- ① 민간 육종가의 분석비용 절감 효과 : 99,295점 x 4,950원 = 약 4억 9천여 만원
- ② 기술지원 효과(육종 연한 단축, 육종과정에 도움, 타 과제 진행에 활용)
- ③ 노동력 절감 효과
- ④ 제품 출시에 도움
- ⑤ 매출에 기여

※ 보통의 경우 기업에서 의뢰 시 의뢰목적과 용도에 대하여는 외부로 공개하지 않으므로 지원서비스로 인하여 어떤 품종을 육성하였는지 정확히 추적할 수는 없음. 따라서 지원서비스에 의한 성과 도출 사례를 구체적으로 제시하거나 이를 정확한 수치로 환산하여 가시화 하기는 어려움이 있음.

(2) 생화학 성분 분석 지원서비스

(가) 성분분석 지원 서비스 현황 (2009년4월10~ 2014년 4월9일)

작물	분석 성분	분석 수량(점)					합계
		1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도 (2012)	5차년도 (2013)	
고추	Capsaicin & dihydrocapsaicin	71	623	510	41	0	1,245
	Capsiate	0	0	16	0	0	16
	Capsaicinoid (4종)	0	0	227	0	0	227
	Sugar	0	0	0	58	0	58
파프리카	Apigenin	0	174	0	0	0	174
수박	Lycopene	439	424	551	319	519	2,252
	Sugar (5종)	0	0	0	0	255	255
	β -carotene	0	0	0	38	0	38
토마토	Lycopene	0	0	0	11	206	217
	β -carotene	0	0	0	11	0	11
호박	β -carotene	18	0	0	0	0	18
멜론	β -carotene	8	0	29	0	0	37
배추	Lycopene	0	0	0	23	0	23
	β -carotene	0	0	0	23	0	23
당근	Lycopene	0	0	0	24	0	24
	β -carotene	0	0	0	24	0	24
감귤	Lycopene	0	0	0	0	37	37
	β -carotene	0	0	0	0	37	37
	Anthocyanin (7종)	0	0	0	0	77	77
	Sugar (5종)	0	0	0	0	103	103
복숭아	Anthocyanin (7종)	0	0	0	266	0	266
	Lycopene	0	0	0	15	0	15
	β -carotene	0	0	0	15	0	15
베리류	Anthocyanin (7종)	0	17	0	105	38	160
쌀	GABA	75	0	0	21	66	162
	Sugar (5종)	0	0	23	0	182	205
구지뽕	GABA	0	0	0	25	0	25
현미효소제품	GABA	0	0	31	65	0	96
양과	Quercetin	0	0	87	22	0	109
땅콩나물	Resveratrol	0	0	0	60	0	60
콩나물	Isoflavone	0	0	0	0	1,432	1,432
합 계		611	1,238	1,474	1,166	2,952	7,441

(나) 성분분석 지원 서비스를 통한 효과

- ① 민간 육종가의 분석비용 절감 효과 : 7,441점 x 36,000원 = 약 2억 6천여 만원
- ② 기술지원 효과
(육종 결과물 확인, 육종 연한 단축, 육종과정에 도움, 타 과제 진행에 활용)
- ③ 노동력 절감 효과
- ④ 제품 출시에 도움(제품의 기능성 확인)
- ⑤ 매출에 기여
- ⑥ 지원 서비스를 통한 성과 도출의 예 (공개 가능한 사례)

	지원서비스 내용		의뢰 기관	지원 년도	지원서비스 효과
	작물	성 분			
사례 1)	수박	Lycopene	파트너 종묘	2010	<ul style="list-style-type: none"> • 품종화 및 상품화 : 수박 라이코펜 성분을 분석해 줌으로써, 고품량 라이코펜 수박의 품종화와 상품화 성과 도출. 리코스위트1호, 2호 및 리코후레쉬 1회, 2호 수박 출시.
사례 2)	배추	Carotinoid	서울대학교	2013	<ul style="list-style-type: none"> • 연구과제 진행, 논문 작성: 배추 카로티노이드 성분을 분석해 줌으로써, 해당 연구과제 진행 및 SCI 논문 작성 성과 도출 (Association of molecular markers derived from the BrCRTIS01gene with polylycopene-enriched orange-colored leaves in Brassica rapa, Seohee Lee <i>et al</i>, 2014)
사례 3)	현미 효소제품	GABA	신지원	2012	<ul style="list-style-type: none"> • 제품 홍보효과(경쟁력 강화) 신지원의 “눈이큰 현미효소”등 3개 효소 제품의 GABA성분을 분석하여 줌으로써 그 기능성을 확인하고 제품 홍보에 활용함.
사례 4)	블랙초크 베리 잎차	Anthocyanin	환평농원	2011	<ul style="list-style-type: none"> • 신제품 출시, 특허 출원 및 등록 환평농원의 블랙초크베리 잎차의 anthocyanin 성분을 분석해 줌으로써 그 기능성을 확인하여 잎차 제품이 출시되었고, 잎차에 관한 특허 2건을 출원하고 등록하였음.
<p>※ 위의 사례는 사업단 내부 과제를 지원한 경우이거나 공개가 가능한 경우로써 지원서비스를 통한 효과를 나타내기 위해 제시된 것임. 그러나 보통의 경우 기업에서 의뢰 시 의뢰목적과 용도에 대하여는 외부로 공개하지 않으므로 지원서비스로 인하여 어떤 품종을 육성하였는지 정확히 추적할 수는 없음. 따라서 지원서비스에 의한 성과 도출 사례를 구체적으로 제시하거나 이를 정확한 수치로 환산하여 가시화 하기는 어려움이 있음.</p>					

(3) 분자 마커 개발

작물	분자 마커 종류	마커 수
벼	자포니카 벼 식미예측 마커 세트	8
벼	인디카 벼 식미예측 마커 세트	18
고추	고추 TMV 저항성 L 특이 마커	3
고추	역병+Rf(PR) multiplexing 마커	2
고추	역병, Rf, msk, CMV 연관 HRM 마커	4
인삼	EST-SSR 인삼 품종 개발 마커 -인삼 상용품종 9종 구분 마커 세트	45 (6)
인삼	엽록체 기반 마커 - 화기삼, 전칠삼, 고려인삼 구별 마커 - 오가과 및 산형과 구별 마커	103 (5) (9)
콩	피틴산 관련 분자마커	2
배추	오렌지 및 일반 내염색 배추 구분 마커	3
계	10 종	188 점

(4) 기능성/생리활성 생화학 성분 정밀 분석 기술 확립

분 류	기능성 성분	대상 작물
Carotenoid	Lycopene, β -carotene (2종 동시분석)	수박, 토마토, 멜론, 호박, 배추, 복숭아, 당근 등 관련 작물
Capsaicinoid	Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate (4종 동시분석)	고추, 파프리카 등 관련 작물
Flavonoid	Apigenin-7-glucoside (Apigetrin)	파프리카 등 관련 작물
	Daidzein, genistein, glycitein, daidzin, genistin, glycitin, malonylgenistin (7종 동시분석)	콩(백태) 등 관련 작물
	Quercetin	양파 등 관련 작물
Anthocyanin	Delphinidin-3-glucoside, Cyanidin-3-galactoside, Cyanidin-3-glucoside, Petunidin-3-glucoside, Pelagonidin-3-glucoside, Peonidin-3-glucoside, Malvidin-3-glucoside (7종 동시분석)	베리, 유색미, 복숭아, 당근, 검정콩 등 관련 작물
Amino acid	ALA, SAR, GLY, ABA, VAL, β -AIB, LEU, ILE, aILE, THR, SER, PRO, ASP, MET, HYP, GLU, PHE, AAA, ORN, LYS, HIS, TYR, C-C, ASN, GLN, TRP, NORV, CYS (28종 동시분석)	벼, 현미제품, 효소제품, 구지뽕 등 관련 작물
	Γ -Aminobutyric acid (GABA)	
Glucosinolates	Glucoiberin, progoitrin, sinigrin, glucoraphanin, gluconapin, glucoerucin, glucobrassicin, neoglucograssicin, 4-methoxyglucobrassicin, 4-hydroxyglucobrassicin, glucotropaeolin (11종 분석)	배추, 양배추, 무, 브로콜리 등 관련 작물
Sugar	Fructose, glucose, sucrose, maltose, raffinose (5종 동시분석)	고추, 쌀, 수박, 사과, 포도, 참외, 마늘 등 관련 작물
Stilbene	Resveratrol	포도, 땅콩, 땅콩나물 등 관련 작물
Organic acid	Citric acid, tartaric acid, malic acid, fumaric acid, lactic acid, acetic acid, succinic acid (7종 동시분석)	포도, 감귤, 사과 등 관련 작물
Ginsenosides	Re, Rg1, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rg2S, Rg2R, Rh1S, Rh1R, Rd, Rg3S, Rg3R, Rh2S, Rh2R (15종 동시분석)	인삼, 홍삼 등 관련 작물
Eleutherosides	Eleutheroside E, Eleutheroside B (2종 동시분석)	오가피, 가시오가피 등 관련 작물
계	92성분	

(5)~(6) 특허 출원 및 등록

번호	년도	특 허 명	구분	출원등록자	출원국	출원등록번호
1	2009	고려인삼의 품종간 및 화기삼과의 구별을 위한 발현유전자 유래 SSR 프라이머 세트 및 이들의 용도	출원	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-0076903
2	2011	토바모바이러스 저항성 고추 육종을 위한 엘 유전자좌의 복대립유전자 판별 분자표지 세트	출원	(주)고추와 육종	대한민국	10-2011-0019191
3	2011	고려인삼 품종의 구별을 위한 발현유전자 유래 SSR 프라이머 세트 및 이들의 용도	출원	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0117154
4	2011	자포니카 쌀의 식미평가용 마커 및 그의 용도	등록	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1101773
5	2012	고려인삼의 품종간 및 화기삼과의 구별을 위한 발현유전자 유래 SSR 프라이머 세트 및 이들의 용도	등록	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1110046
6	2013	고려인삼 엽록체 지놈 완전 해독기반 품종 및 종 간 구별 마커와 프라이머 세트 및 이를 포함하는 키트	출원	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0040184
7	2013	고함량 라이코펜을 축적하고 오렌지색을 나타내는 배추 품종을 구분하기 위한 CRTISO1 유전자와 이를 검증하는 마커 및 그의 용도	출원	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0087717
8	2013	다양한 인삼가공제품에 혼입된 화기삼 판별 프라이머 및 그의 방법	등록	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1337923
9		인디카벼 식미 검정용 마커 셀	출원 예정	서울대학교 산학협력단	대한민국	
10		고추의 캡사이시노이드 함량을 낮추는 LP1 주동 유전자 연관 분자표지	10월 중순 출원 예정	(주)고추와 육종	대한민국	

(7)~(9) 품종 육성

	년도	작물	특징	품종	구분	출원 등록자	출원 등록국	출원등록번호	비고
1	2011	수박	고함량 라이코펜	리코스위트1호	품종보호 출원	파트너종묘	대한 민국	출원 2011-484	품종 명칭 등록
2	2011	수박	고함량 라이코펜	리코스위트2호	품종보호 출원	파트너종묘	대한 민국	출원 2011-485	품종 명칭 등록
3	2013	수박	고함량 라이코펜	리코후레쉬1호	품종보호 출원	파트너종묘	대한 민국	출원 2013-23	품종 명칭 등록
4	2013	수박	고함량 라이코펜	리코후레쉬2호	품종보호 출원	파트너종묘	대한 민국	출원 2013-24	품종 명칭 등록
5	2014	수박	고함량 라이코펜	리코후레쉬1호	품종보호 등록	파트너종묘	대한 민국	제4887호	
6	2012	벼	흑미 거대배아	서농 14호	품종보호 등록	서울대학교 산학협력단	대한 민국	제4177호	

(12)~(13) 사업화 / 상품화

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요			
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태
고함량 라이코핀 수박 판매	고함량라이코핀 품종들을 생식용 수박 또는 라이코핀추출용 수박재배를 위하여 국내, 해외에 시교재배중이고, 일부는 내수 및 수출중임.	파트너 종묘	김용재	6	신제품 개발

제품(상품)명	제품(상품)설명	출시시점	판매 국가	매출액 발생 년도	매출액 (천원)	순이익 (천원)
리코스위트 1호	고함량 라이코핀 수박품종	2011년 10월	한국	2014년	500천원	300천원
리코스위트 2호	고함량 라이코핀 수박품종	2011년 10월				
리코후레쉬 1호	고품질, 고함량 라이코핀 수박품종	2013년 1월				
리코후레쉬 2호	고품질, 고함량 라이코핀 수박품종	2013년 1월	베트남	2013년	3,200천원	1,800천원

(14) 수출 계약

제품(상품)명	상품 출시 시점	수출상대국	수출 계약 시점	수출 규모
리코후레쉬 2호 (고함량 라이코핀 수박)	2011년 10월	베트남	2013년 8월	3,000 US\$

(18) 연구 거점 확보

명칭	국가	주요 연구 분야	연구 인력	연구 시작일	주요 내용
세대 진전 시험포	태국	고부가가치 계통 및 품종개발	1명	2011년 3월 10일	태국 콘깬지역에 수박 연구용 시험포장 운영
<p>* 이점 및 기대 효과 :</p> <p>세대진전, 시교생산 및 열대지방의 수출용 육성기지로 활용하여 보다 효율적이고 빠른 계통 육성 및 품종개발이 가능하여 고부가가치 품종 종자의 내수 및 수출 시장 확대에 많은 장점이 있음.</p>					

(19) 논문

건수	게재년도	SCI구분	학술지명	Vol (No.)	논문명	저자명			비고
						제1저자	공동저자	교신저자	
1	2010	SCI	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	53 (4)	Rice Protein Disulfide Isomerase (OsPDI) and Rice Chaperone Binding Protein (OsBiP) Levels Are Not Directly Correlated with the Eating Quality of Rice	Yeon Jeong Kim	Soon Ho Choi, Yun Jung Han, In-Cheol Jang, Jong Tae Song, Seong Hee Bhoo	Hak Soo Seo	
2	2010	KCI	Korean Journal of Breeding Science.	42 (2)	Epistatic Relationships among Genes Related to Endosperm Starch Synthesis in Rice.	Joohyun Lee	-	Hee-jong Koh	
3	2011	SCI	Theoretical and Applied Genetics	123 (4)	QTL identification of flowering time at three different latitudes reveals homeologous genomic regions that control flowering in soybean	Weixian Liu	Moon Young Kim, Yang Jae Kan, Kyujung Va, Yeong-Ho Lee, Peerasak Srinives, Dong Lin Yuan	Suk-Ha Lee	
4	2011	SCI	Theoretical and Applied Genetics	122 (7)	Fine mapping and candidate gene analysis of dense and erect panicle 3, DEP3, which confers high grain yield in rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Yongli Qiao	Rihua Piao, Jinxia Shi, Song-I Lee, Wenzhu Jiang, Baek-Ki Kim, Joohyun Lee, Longzhi Han, Wenbo Ma	Hee-Jong Koh	
5	2011	SCI	Journal of Heredity	106 (2)	Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotype Diversity in Rice Sucrose Synthase 3	PUJI LESTARI	GIAN LEE, TAE-HO HAM, REFLINUR, MI-OK WOO, RIHUA PIAO, WENZHU JIANG, SANG HO CHU, JOOHYUN LEE	Hee-jong Koh	
6	2012	SCI	Korean Journal of Horticultural Science & Technology	30 (1)	Validity Test for Molecular Markers Associated with Resistance to Phytophthora Root Rot in Chili Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Won Phil Lee	JunDae Lee, Jung-Heon Han, Byoung Cheorl Kang	Jae Bok Yoon	
7	2012	SCI	Korean Journal of Horticultural Science & Technology	30 (3)	A Set of Allele-specific Markers Linked to L Locus Resistant to Tobamovirus in <i>Capsicum</i> spp.	Jundae Lee	Jung-Heon Han	Jae Bok Yoon	
8	2012	SCI	Journal of Ginseng Research	36 (3)	EST-SSR Marker Sets for Practical Authentication of All Nine Registered Ginseng Cultivars in Korea	Nam-Ho on Kim	Choi Hong-Il, Ahn In-Ok	Tae-Jin Yang	지재권 전환

건수	게재년도	SCI구분	학술지명	Vol (No.)	논문명	저자명			비고
						제1저자	공동저자	교신저자	
9	2012	KCI	Korean Journal of Breeding Science	44 (4)	Inheritance of Resistance to Phytophthora Root Rot in Chili Pepper Depending on Inoculum Density and Parental Genotypes	Jundae Lee	Won Phil Lee, Byoung Cheorl Kang	Jae Bok Yoon	
10	2013	KCI	한국육종학회	45 (1)	벼 종자 배아함몰도의 품종간 변이	이길응	박일화	고희중	
11	2013	기타	HAYATI Journal of Biosciences	20 (1)	Development of New CAPS/dCAPS and SNAP Markers for Rice Eating Quality	PUJI LESTARI	-	Hee-jong Koh	
12	2014	SCI	Theoretical and Applied Genetics	127 (2)	Association of molecular markers derived from the BrCRTISO1gene with prolycopene-enriched orange-colored leaves in Brassica rapa	Seohee Lee	Sang-Choon Lee, Dong Hae Byun, Dong Young Lee, Jee Young Park, Jong Hoon Lee, Hyun Oh Lee, Sang Hyun Sung	Tae-Jin Yang	지재권 전환
13	2014	SCI	Plant Breeding		Diagnostic DNA markers for eating quality of <i>indica</i> rice	PUJI LESTARI	WENZHU JIANG, SANG-HO CHU, REFLINUR, SUTRISNO, BRAM KUSBIANTORO, BACKKI KIM, RIHUA PIAO, YOUNG-CHAN CHO	Hee-jong Koh	투고 중
14	2014	SCI	Korean Journal of Horticultural Science & Technology		고추의 캡사이시노이드 함량을 낮추는 LP1 주동 유전자 유전 분석 및 연관 분자표지 개발	Seok Jin Park	JunDae Lee;	Jae Bok Yoon	10월 중순 투고 예정
15	2014	SCI	Genetic Resources and Crop Evolution		Transferability of novel microsatellites markers and genetic relationship of Panax ginseng and eight Araliaceae species	Woojong Jang	-	Tae-Jin Yang	투고 예정
16	2014	SCI	Protome Science		Shotgun proteomics analysis for monitoring leaf proteome response during drought stress in Brassica napa.	Heejin Kim		Joohyun Lee	투고 예정

(20) 학술 대회 발표

	저자	발표제목 (구두/포스터)	발표날짜	학술대회 명칭	발표장소
1	Jundae Lee, Jung-Heon Han, Jae Bok Yoon	Development of L allele differential markers for tobamovirus resistance in Capsicum spp. (포스터)	2009-04-23	한국식물병리학 임시총회 및 춘계학술발표회	대한민국/ 예산
2	Wenzhu Jiang, Sang-Ho Chu, Tae-Ho Ham, Young-Il Cho, Joong-Hyun Chin, Longzhi Han, Donglin Yuan, Luyuan Dai, Jong-Doo Yea, and Hee-Jong Koh	Genotypic × environment interactions for agronomic traits of rice recombinant inbred lines under low temperature conditions.(포스터)	2009-07-02	한국육종학회 40주년 기념 심포지엄 및 정기학술발표회	대한민국/ 대전
3	Yongli Qiao, Wenzhu Jiang, Min-Seon Choi, Rihua Piao, Sang-Ho Chu, Mi-Ok Woo, JooHyun Lee and Hee-Jong Koh	Identification of a new spotted leaf 28 mutant in rice(포스터)	2009-07-02	한국육종학회 40주년 기념 심포지엄 및 정기학술발표회	대한민국/ 대전
4	Min-Seon Choi, Sang-Ho Chu, Eun-Byeol Koh, Rihua Piao, Tae-Ho Ham and Hee-Jong Koh	Identification and mapping of sugary endosperm genes in Rice.(포스터)	2009-10-22	2009년 한국작물학회 추계학술발표회	대한민국/ 광주
5	Jun Ha Kim, Hong-Il Choi, Jee Young Park, Jong-Hoon Lee, Nam-Hoon Kim, Ju-Yeon Jung, In-Ok Ahn, Shailendra Karki, Izzah Nur Kholilatul, Sampath Perumal, Tae-Jin Yang	Genetic Diversities of the Chloroplast Intergenic regions in Panax species and its practical application to identify the origin of ginseng (포스터)	2009-10-22	2009년 한국작물학회 추계학술발표회	대한민국/ 광주
6	Nam-Hoon Kim, Hong-Il Choi, Jee Young Park, Jun Ha Kim, Jong Hoon Lee, Ju Yeon Jung, Yun sun Lee, Sampath Perumal, Songquan Wu, Shailendra Karki, Izzah Nur Kholilatul, Beom-soon Choi, Tae-Jin Yang,	Development and application of SSR-HRM markers derived from EST sequence for identification of korean ginseng cultivar (포스터)	2009-10-22	2009년 한국작물학회 추계학술발표회	대한민국/ 광주
7	Jundae Lee, Won Phil Lee, Jung-Heon Han, Jae Wahng Do, Jae Bok Yoon	Valuable molecular markers associated with several important traits for breeding commercial F1 variety of chilli pepper in Korea (포스터)	2009-11-13	The 6th Solanaceae Genome Workshop	인도/뉴델 리
8	Puji Lestari, Gi-An Lee, Tae-Ho Ham, Refflinur Basyirin, Mi-Ok Woo, Rihua Piao, Wenzhu Jiang, Sangho Chu, Joohyun Lee, Hee-Jong Koh	Single nucleotide polymorphism and haplotype diversity in the rice sucrose synthase 3(포스터)	2009-11-17	6th International Rice Genetics Symposium & 7th International Symposium on Rice Functional Genomics	필리핀/마 닐라
9	윤재복	고추 응성불임성 및 주요 병 저항성 분자표지 개발 및 이를 이용한 유전자원 평가 (구두)	2009-12-18	제2회 식물유전체육종연 구소 심포지엄 및 제5회 한국식물분자표지 연구회 및 한국육종학회 젊은육종가협의회	대한민국/ 서울
10	Nam-Hoon Kim, Hong-Il Choi, Jee Young Park, Jun Ha Kim, JongHoon Lee, Ju Yeon Jung, Yun sun Lee, Beom-soon Choi, In Ok Ahn, Tae-Jin Yang	Progress on genetic mapping and genomics for Korean ginseng (포스터)	2010-01-11	Plant & Animal Genome	미국/ San Diego

	저자	발표제목 (구두/포스터)	발표날짜	학술대회 명칭	발표장소
11	Kwang-Soo Han, Minyoung Yoon, Sue Kyung Kim, Wonjoo Hwang, Moon Young Kim, Kyujung Van, Yeong-Ho Lee, and Suk-Ha Lee	Genetic variatioin and marker development for genes related to phytic acid in soybean (포스터)	2010-04-08	한국작물학회 춘계학술대회	대한민국/ 대전
12	Songyee Lee, Yongli Qiao, Wenzhu Jiang, JooHyun Lee, BongSoo Park, Min-Seon Choi, Rihua Piao, Mi-Ok Woo, Nam-Chon Paek, Hak Soo Seo, and Hee-Jong Koh	An SPL28 gene encoding clathrin-associated adaptor protein complex 1 medium subunit $\mu 1$ (AP1M1)is responsible for spotted leaf and early senescence in rice.(포스터)	2010-04-14	Crop Functional Genomics 2010	대한민국/ 제주
13	Yun Joo Lee, Min-seon Choi, Rihua Piao and Hee-Jong Koh	Mapping of sugary endosperm genes in rice.(포스터)	2010-07-08	2010년 한국육종학회 정기 학술발표회 및 심포지엄	대한민국/ 대전
14	Nam-Hoon Kim, Hong-Il Choi, Ju-Yeon Jung, Beom-Soon Choi, In-Ok Ahn, Joon-Soo Lee, and Tae-Jin Yang	Development of EST-SSR markers and its application for breeding and authentication of Korean ginseng cultivars (포스터)	2010-09-15	The 10th International Symposium on Ginseng	대한민국/ 서울
15	Ju-Yeon Jung, Jun Ha Kim, Jee Young Park, Hong-Il Choi, Jonghoon Lee, Nam-Hoon Kim, In-Ok Ahn and Tae-Jin Yang	Authentication of Korean ginseng products from putative mixing of American and Sanchi ginseng using DNA markers (포스터)	2010-09-15	The 10th International Symposium on Ginseng	대한민국/ 서울
16	Nam-Hoon Kim, Hong-Il Choi, Ju-Yeon Jung, Beom-Soon Choi, In-Ok Ahn, Joon-Soo Lee, and Tae-Jin Yang	Development of SSR markers for genetic mapping of Korean ginseng and authentication of Korean ginseng cultivars (구두)	2010-10-07	한국자원식물학회 추계학술발표회	대한민국/ 제주
17	Ju-Yeon Jung, Jun Ha Kim, Jee Young Park, Hong-Il Choi, Jonghoon Lee, Nam-Hoon Kim, and Tae-Jin Yang	Genetic diversity and evolution of four major Panax species and comparative study in the Order Apiales (포스터)	2010-10-07	한국자원식물학회 추계학술발표회	대한민국/ 제주
18	Kwang-Soo Han, Min-Young Yoon, Sue Kyung Kim, Wonjoo Hwang, Moon Young Kim, Yeong-Ho Lee, Suk-Ha Lee	Genetic variation and marker development $\mu 1$ genes related to phytic acid content in soybean (포스터)	2010-10-21	한국작물학회 추계학술대회	대한민국/ 부산
19	윤재복,이준대,도재왕,권오열	고추의 매운맛 함량에 관한 유전분석(포스터)	2010-10-22	한국원예학회	대한민국/ 청주
20	Bong Soo Park, Yun Jung Han, Ga Hyun Son, Hak Soo Seo	Sumoylation Regulates Nitrate Reduction, The First Step Of Nitrogen Assimilation In Plants (포스터)	2010-10-25	2010 Cold Spring Harbor Asia Conference	중국/ 상하이
21	Min-Seon Choi, Yun Joo Lee, Sang-Ho Chu, Eun-Byeol Koh, Rihua Piao, Tae-Ho Ham, Hee-Jong Koh	Identification and Mapping of Sugary Gene in The Sugary Endosperm-2 Mutant of Rice(포스터)	2010-11-09	3rd International Rice Congress 2010	베트남/ 하노이
22	윤재복,이준대,이원필,한정현,도재왕	고추의 옹성불임성 및 주요 병 저항성 분자표지 개발 및 이용 (구두)	2010-12-03	한국고추연구회	대한민국/ 화성
23	Nam-Hoon Kim, Hong-Il Choi, Ju-Yeon Jung, Beom-Soon Choi, In-Ok Ahn Joon-Soo Lee and Tae-Jin Yang	Development of SSR markers in Korean ginseng for genetic mapping and authentication of ginseng cultivars (구두)	2010-12-13	고려인삼학회 추계학술대회	대한민국/ 서울

	저자	발표제목 (구두/포스터)	발표날짜	학술대회 명칭	발표장소
24	Ju-Yeon Jung, Jun Ha Kim, Nam-Hoon Kim, Hong-Il Choi, Jee Young Park, Jonghoon Lee, In-Ok Ahn, and Tae-Jin Yang	Genetic diversity of Panax species revealed by comparison of the entire intergenic regions of chloroplast genome and practical application of developed DNA markers (구두)	2010-12-13	고려인삼학회 추계학술대회	대한민국/ 서울
25	Yun Joo Lee, Min-seon Choi, Rihua Piao and Hee-Jong Koh	Studies of fine mapping of sugary endosperm genes in rice(포스터)	2011-07-07	2011년 한국육종학회 정기 학술발표회 및 심포지엄	대한민국/ 무주
26	이준대, 도재왕, 박석진, 홍순철, 한정현, 윤재복	고추의 매운맛 함량을 낮추는 유전자와 연관된 AFLP 분자표지 탐색(포스터)	2011-10-27	2011년 추계원예학회	대한민국/ 목포
27	K.-S. HAN, K. VAN, Y.-H. LEE, S.-H. LEE	Development of SNAP marker for phytic acid content in soybean (포스터)	2012-01-13	12th SABRAO	태국/ 치앙마이
28	김경희, 정주연, 김준하, 김남훈, 최홍일, 박지영, 이종훈, 안인옥, 양태진	Comparative analysis of Panax ginseng chloroplast genomes and development of CP genome-derived DNA marker (포스터)	2012-04-23	고려인삼학회 춘계 학술대회	대한민국/ 제주
29	Yun Joo Lee, Min-Seon Choi, Rihua Piao, Eunbyeol Koh and Hee-Jong Koh	Characterization and genetic analysis of Hwacheong sugary-2 mutant in rice(포스터)	2012-07-05	2012년 한국육종학회·식 물분자유종사업단 공동 국제심포지엄	대한민국/ 대구
30	김경희, 정주연, 김준하, 김남훈, 최홍일, 박지영, 이종훈, 안인옥, 양태진	Taxon Identification and Development of Panax ginseng chloroplast genome-derived DNA marker using Next Generation Sequencing strategy (포스터)	2012-07-05	2012년 한국육종학회·식 물분자유종사업단 공동 국제심포지엄	대한민국/ 대구
31	이서희, 이상춘, 변동해, 김재광, 박지영, 이종훈, 주혜준, 이준기, 무루, 양태진	Carotenoid Content and Biosynthesis Genes in orange-colored Chinese cabbage (포스터)	2012-07-05	2012년 한국육종학회·식 물분자유종사업단 공동 국제심포지엄	대한민국/ 대구
32	윤재복, 이준대, 도재왕, 박석진, 한정현	고추에서 캡사이신 합성과 관련된 Pun3 유전자 (포스터)	2012-07-05	2012년 한국육종학회·식 물분자유종사업단 공동 국제심포지엄	대한민국/ 대구
33	김경희, 정주연, 김준하, 김남훈, 최홍일, 박지영, 이종훈, 안인옥, 양태진	Comparative analysis of Korean ginseng chloroplast genomes and CP genome-derived DNA marker development (포스터)	2012-09-05	국제인삼심포지엄	중국/ 길림
34	김경희, 정주연, 김준하, 김남훈, 최홍일, 박지영, 이종훈, 안인옥, 양태진	Complete sequencing of chloroplast genomes of two Panax ginseng cultivars reveal unique intra species variation (포스터)	2012-10-25	한국약용작물학회	대한민국/ 음성

	저자	발표제목 (구두/포스터)	발표날짜	학술대회 명칭	발표장소
35	Tae-Jin Yang, Seohee Lee, Sang-Choon Lee, Dong Hae Byun, Rira Ha, Jee Young Park, Jong Hoon Lee, Hyejoon Joo, Junki Lee, Murukarthick Jayakodi, and Hyun Oh Lee	Development of Molecular Markers and Identification of gene responsible for prolycopene enriched orange-colored leaves in Kimchi-cabbage, Brassica rapa (포스터)	2013-04-16	3rd international symposium on Genomics of Pant Genetic Resources	대한민국/ 제주도
36	Hijin Kim, Jaebok Cho, Joohyun Lee	Identification of the candidate proteins related with drought stress in Brassica rapa ssp. pekinensis (inbred line 'chiifu') using shotgun proteomics analysis(포스터)	2013-04-16	3rd international symposium on Genomics of Pant Genetic Resources	대한민국/ 제주도
37	Yunjoo Lee, Gileung Lee, Rihua Piao, Sunmi Jang and Hee-Jong Koh	Genotypic Variation of Embryo Dent of Rice Grains(포스터)	2013-07-04	2013 한국육종학회-차세대BG21사업단 공동심포지엄	대한민국/ 청주
38	Hee-Jong Koh, Puji Lestari	Prediction of cooked rice taste using diagnostic DNA markers(구두)	2013-11-08	7th International Rice Genetics Symposium	필리핀/ 마닐라
39	Yun Joo Lee, Sun Mi Jang, Min-Seon Choi, Rihua Piao, Eunbyeol Koh and Hee-Jong Koh	Genetic analysis of sugary endosperm in rice(포스터)	2013-11-06	7th International Rice Genetics Symposium	필리핀/ 마닐라

(21) 교육 지도

	교육 명	날짜	내 용	교재	교육 장소	교육 대상	교육생 수(명)	비고 ^{가)}
1	식물 분자표지 이용 육종기술 워크숍	2009.11.30.-12.4	식물 분자표지 이용 육종기술에 대한 강의와 실습	식물분자표지이용 육종기술	서울 대학교	민간 육종가	22	주최, 강사
2	식물분자표지이용 육종기술워크숍	2010.11.15.-11.19	식물 분자표지 이용 육종기술에 대한 강의와 실습	식물분자표지이용 육종기술	서울 대학교	민간 육종가	21	주최, 강사
3	식물분자표지이용 육종기술 워크숍	2011.06.27.-07.01	식물 분자표지 이용 육종기술에 대한 강의와 실습	유전체시대 채소육종전문가과정	서울 대학교	민간 육종가	25	주최, 강사
4	식물분자표지이용 육종기술 워크숍	2012.06.25.-06.29	식물 분자표지 이용 육종기술에 대한 강의와 실습	-식물분자표지이용 육종기술, -식물분자표지이용 육종기술 실험실습 자료집	서울 대학교	민간 육종가	20	주최, 강사
5	식물분자표지이용 육종기술워크숍	2013.06.24.-06.28	식물 분자표지 이용 육종기술에 대한 강의와 실습	-식물 내병성 육종기술, -식물 내병성 육종기술 실험실습 자료집	서울 대학교	민간 육종가	17	주최, 강사
6	진천군 수박 대학 전문가 초청 교육	2009.09.22	라이코핀 품종개발 연구과제 소개	소비자중심 특성 강화 수박 품종 개발	진천군농업기술센터	진천군 수박대학 수강생 (수박재배 농가)	60	강사
7	시설농업연구회 전문가 초청교육	2009.12.24	라이코핀 품종개발 연구과제 소개	고품질 수박 재배 기술과 가능성 품종 육종	충북 음성 수박연구소	진천군, 음성군 시설농업연구회 회원	60	강사
8	고창 수박연구회 회원교육	2012.07.05	개발된 고품질 라이코핀 품종의 특성 및 재배방법 교육	현장 실습	파트너종묘안성연구소 시험포장	수박유통관련 바이어 및 고창수박연구회 회원	15	강사

가) 주최: 사업단이 교육을 주최한 경우,

강사: 사업단 소속 과제 책임자 및 연구원이 교육 강사인 경우

(23) 타 연구에 활용

	연구 사업명	과제명	책임자 (소속)	과제발주처 (부처)	활용 년도	활용 내용
1	국가 연구개발 특허기술 동향 조사 사업	연구과제에 대한 대응특허조사 지원 사업	최윤석 (R&D특허 센터)	특허청	2010	대응특허 조사 지원 사업에 선정되어 정보 제공. 특허청 연구 보고서 “작물 육종을 위한 품질분석 지원 대응특허조사“ 작성.
2		민간육종연구단지 육종지원서비스 구축 및 운영 방안	강병철 (서울대학 교)	농업기술실 용화재단	2013	민간육종연구단지 조성을 위한 농업기술실용화재단의 용역과제 “육종지원서비스 구축 및 운영 방안”에 참여 하고 보고서 작성.

(24) 전시회

	전시회 명	주최	날짜	장소	내용
1	농업연구사업단 성과발표회 및 전시회	농림축산식품부	2011.05.11	aT센터	사업단의 우수성과 발표 및 질의 응답, 행사장 로비에 우수성과 판넬 전시, 행사장 로비 사업단 지정 테이블에서 지원서비스에 관한 질의 응답 및 홍보물 배포
2	고함량 라이코핀 수박 홍보회	파트너종묘, 고창수박연구회	2012.07.04	파트너종묘 안성연구소	고함량 라이코핀 수박 품종(리코스위트 1호, 리코스위트 2호 외 15조합)의 품종평가 및 시식
3	충북 수박산학협력단 심포지엄 및 우수 수박 전시회	충북 수박 산학협력단	2012.07.06	충북농업기술원 수박연구소	리코스위트1호 등 기능성 품종 전시 및 시식회
4	고창 고품량 라이코핀 수박 품평회	이서종묘	2012.09.26	전북 고창 아산면 수박농가시험포	고함량 라이코핀 수박의 생육특성, 라이코핀 추출조사, 품종평가

(25) 저작물

	제작 시기	유 형	제 목	저자	활용내역
1	2009년 11월	책 (이론+실습 교재)	식물분자표지이용 육종기술	- (사)한국종자연구회 - 작물육종지원사업단 - 서울대학교 식물유전체 육종연구소	식물 분자표지 이용 육종기술 교육 교재
2	2010년 11월	책 (이론+실습 교재)	식물분자표지이용 육종기술	- (사)한국종자연구회 - 작물육종지원사업단 - 채소육종연구센터 - 서울대학교 식물유전체 육종연구소	
3	2011년 6월	책 (이론+실습 교재)	유전체시대 채소육종 전문가 과정	- (사)한국종자연구회 - 작물육종지원사업단 - 채소육종연구센터 - 채소병리검정지원사업단 - 서울대학교 식물유전체 육종연구소	
4	2012년 6월	책 (이론교재)	식물분자표지이용 육종기술		
5	2012년 6월	책 (실습교재)	식물분자표지이용 육종기술 실험 실습서		
6	2013년 6월	책 (이론교재)	식물 내병성 육종기술		
7	2013년 6월	책 (실습교재)	식물 내병성 육종기술 실험 실습서		

(26) 매뉴얼

제 목	내 용	작 성 자	활 용 도
작물육종지원사업단 표준 분석법 SOP (Standard Operating Procedures)	개발한 기능성/생리활성 생화학 성분에 관한 표준 분석법. ※ 별첨 4: 성분분석법 표준화 SOP 참조	서울대학교 김정한 하리라	- 지원사업에 기 활용 - 지원사업 상설기구화시 활용 - 타 기관에서 요구시 기술 전수 시 활용

(27) 인력양성

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타 ^{가)}	남	여	수도권	대전	기타지역
11	2	7		2	4	7	11		

가) 분자마커 및 성분분석 지원서비스 전문 인력 각 1명 씩 양성.

(28) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외
		2 명 x 2 회 (서울대학교 농업생명과학대학 농생명과학공동기기원 NGS-library 제작관련 연수)	

(29) 언론 홍보

유 형	매체명	제 목	날 짜
신문	한국경제	작물육종 기술정보 구축-전문가도 양 성, 작물육종지원사업단	2010-06-03
월간 잡지	NewsMaker	한국을 이끄는 혁신리더-서울대 작물육 종지원사업단	2010-08-02

(30) 기타 홍보(수상 실적)

일 자	명 칭	내 용
2013년 12월 31일	농림축산식품부 장관 표창 (농림축산식품 제85151호)	- (주)고추와 육종 대표이사 윤재복 (제 1-3세부과제 책임자) - 종자산업 육성 및 민간육종 활성화를 통하여 종자산업 발전에 이바지한 공로에 대한 표창.

(31) 설문조사

시기	대상	내용	활용
1) 2009년 11월, 2) 2010년 11월, 3) 2011년 6월, 4) 2012년 6월, 5) 2013년 6월,	분자표지 활용 워크숍 교육생	- 교육에 대한 이해도 및 만족도 조사 ※ 별첨5: 식물 분자표지 이용 육종기술 교육훈련 평가 설문지 참조.	차기 교육 개선에 반영.
2012년 3월	지원서비스 의뢰자 및 서비스 미이용 민간 육종기업	- 지원서비스에 대한 만족도 및 요구사항 조사 ※ 별첨6: 작물육종지원사업단 설문지 참조.	서비스에는 만족하나 분석료 인하에 대한 요구가 커서 개선에 반영하지 못함.

(32) 행사 개최

	행 사 명	날 짜	장 소	비고
1	작물육종지원사업단 사업 설명회	2009년 7월 22일	국립종자원	주 관
2	한국고추연구회 20주년 기념 국제심포지엄	2011년 09월22일.-23일	충북대학교	공동주최
3	서울대학교 식물유전체육종연구소 국제 심포지엄 “Molecular Markers for Breeding Quality and functional Traits”	2011년 11월 22일	서울대학교	공동주최
4	농림축산식품부 지원사업 관련 과제 합동 협의회	2012년 3월 19일	서울대학교	주 관
5	서울대학교 식물유전체육종연구소 국제 심포지엄 “분자표지와 식물잡종강세 육종”	2013년 12월 11일	서울대학교	공동주최

2. 핵심 기술 개발 결과

가. 핵심기술의 기술적 수준

구분	핵심 기술 명	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
		세계 최초	국내 최초	외국기 술 부제	외국기술 소화· 흡수	외국기술 개선· 개량	특허 출원	산업체 이전 (상품화)	현장에 모 해 결	정책 자료	기타
1	자포니카 벼 식미 예측 마커 개발 및 개량	√	√			√		√			
2	인디카 벼 식미 예측 마커 세트 개발	√	√			√		√			
3	고품질 육종을 위한 분자 마커 및 기능성 생리활성 생화학 성분 분석 지원서비스 시스템 구축		√							√	√
4	GABA 분석 기술 (현미, 유색미 등 곡류)				√	√		√			
5	Isoflavone (7종) 동시 분석 기술 (콩, 유색미 등)				√	√		√			
6	Anthocyanin (7종) 동시 분석 기술 (복숭아, 페리류 등)				√	√		√			
7	Glucosinolates (11종) 동시 분석 기술 (배추, 양배추 등 십자화과 식물)				√	√		√			
8	당류 (5종) 동시 분석 기술 (과일류 등)				√	√		√			
9	Resveratrol 성분 분석 기술 (포도 등)				√	√		√			
10	유기산 성분 (7종) 동시 분석 기술 (과일류 등)				√	√		√			
11	Ginsenosides (15종) 동시 분석 기술 (인삼 등)				√	√		√			
12	Eleutherosides (2종) 동시 분석 기술 (가시오가피 등)				√	√		√			
13	Lycopene, β-carotene (2종) 동시 분석 기술 (수박, 멜론 등)				√	√		√			
14	Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate (4종) 동시 분석 기술 (고추 등)		√		√	√		√			

구분	핵심기술명	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)					
		세계 최초	국내 최초	외국기술 부제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허출원	산업체 이전 (상품화)	현장에 로 해결	정책자료	기타	
15	Apigenin-7-glucoside 성분 분석 기술 (파프리카 등)		√		√	√			√			
16	Quercetin 성분 분석 기술 (양파 등)				√	√			√			
17	아미노산 (28종) 동시 분석 기술 (현미 등)				√	√			√			
18	고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자 판별 마커 세트	√	√		√	√		√				
19	고추 분자표지 multiplexing 기술 개발	√	√						√			
20	기 개발된 고추 마커를 HRM 마커로 전환	√	√						√			
21	고추 매운맛 함량 조절유전자 연관 마커 후보 및 유전분석	√	√					√	√			
22	고려인삼 상용품종 9품종의 구별이 가능한 마커 조합 기술	√	√						√		√	
23	고려인삼, 미국삼, 전칠삼 구별이 가능한 마커 개발 및 이를 이용한 인삼 가공 제품내의 기원 품종 판별 기술	√	√						√		√	
24	고함량 라이코펜 축적하고 오렌지색을 나타내는 배추 판별이 가능한 마커 개발 및 이용 기술	√	√						√			
25	지부배추 유묘기 단백질 대량동정 기술		√									√
26	배추 건조 저항성 단백질체 동정을 통한 건조 저항성 관련 유전자 규명		√						√			
27	고함량 라이코펜 품종		√							√		
28	열대지역에서의 세대진전 체계 확립		√				√					

나. 각 연구 결과별 구체적 활용계획

구분	핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
1	자포니카 벼 식미 예측 마커 개발 및 개량	수치화 하기 어려운 식미를 마커 세트로 검증 할 수 있게 한 특보적 기술로, 2009년도 처음 개발한 마커 세트를 더욱 쉽고 빠르게 검증 할 수 있게 일부로 새로 개발하고 개량하였음. 향후 식미 연구 분야에 두루 사용 될 수 있으며, 특히 쉽고 빠르게 식미를 검증할 수 있게 되었음.
2	인디카 벼 식미 예측 마커 세트 개발	인디카 벼는 외형뿐만 아니라 길감, 점도 등의 성질이 자포니카와 상이하여, 자포니카와는 구별되는 새로운 식미 예측 마커의 개발을 필요로 하고 있음. 본 연구는 수치화하기 힘든 식미치를 분자 마커를 이용해 높은 정확도로 수치화 한 세계 최초의 시도이며, 자포니카 벼 뿐만아니라 식미를 측정하기 까다로운 인디카 벼까지 전 세계 재배벼의 식미를 분자 마커를 통해 예측할 수 있게 되었다는 점에서 그 의미가 크다고 보여짐. 이 결과는 또한 추후 MAS를 이용한 고식미 품종 육종에 일조할 수 있을 것이라 기대 됨.
3	고품질 육종을 위한 분자 마커 및 기능성 생리활성 생화학 성분 분석 지원서비스 시스템 구축	민간 육종 분야를 오직 “지원”하기 위한 목적으로 분자마커 분석이나 성분분석 서비스를 제공하는 기관이 거의 전무한 상황가운데 2009년부터 5년동안 본 사업단은 대민을 상대로 수요를 끈임 없이 분석하고, 맞춤형 분석법 개발 및 지원서비스에 노력하였음. 이를 통하여 국내 실정에 맞는 지원 체계를 구축했다고 할 수 있으며 그 기술력 및 노하우는 현재 추진 중인 종자산업진흥센터로 전수 되어 국가 기반 육종 지원 시스템의 확장 및 체계화에 크게 도움을 줄 수 있다고 보여짐.
4	GABA 분석 기술 (현미, 유색미 등 곡류)	
5	Isoflavone (7종) 동시 분석 기술 (콩, 유색미 등)	
6	Anthocyanin (7종) 동시 분석 기술 (복숭아, 베리류 등)	
7	Glucosinolates (11종) 동시 분석 기술 (배추, 양배추 등 십자화과 식물)	
8	당류 (5종) 동시 분석 기술 (과일류 등)	
9	Resveratrol 성분 분석 기술 (포도 등)	

- 지원서비스 상설기화시 서비스에 활용
- 타 연구사업 지원에 활용
- 타 기관에 기술 전수

구분	핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
10	유기산 성분 (7종) 동시 분석 기술 (과일류 등)	
11	Ginsenosides (15종) 동시 분석 기술 (인삼 등)	
12	Eleutherosides (2종) 동시 분석 기술 (가시오가피 등)	
13	Lycopene, β -carotene (2종) 동시 분석 기술 (수박, 멜론 등)	
14	Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate (4종) 동시 분석 기술 (고추 등)	
15	Apigenin-7-glucoside 성분 분석 기술 (썬프리카 등)	
16	Quercetin 성분 분석 기술 (양파 등)	
17	아미노산 (28종) 동시 분석 기술 (현미 등)	
18	고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자 판별 마커 세트	현재 수출용 고추의 TMV 저항성 분자유종에 활용. 또한 새로 도입된 유전자원에서 TMV 저항성 유무를 간편하게 판별하는데 활용. 차후 L allele 분리에 중요 역할을 할 것으로 기대
19	고추 분자표지 multiplexing 기술 개발	고추 역병 저항성 주동유전자와 회복 유전자에 연관된 분자마커 동시 검정을 통해 마커 분석 시간 단축, 이를 마커 분석 효율 증대
20	기 개발된 고추 마커를 HRM 마커로 전환	다른 형질의 HRM 마커 전환에 활용. 신속한 분자마커분석 서비스에 적극 활용.
21	고추 매운맛 함량 조절유전자 연관 마커 후보 및 유전분석	고추 매운맛 함량 조절유전자 가운데 매운맛 낮추는 유전자와 긴밀하게 연관된 분자 마커 개발을 위한 자료로 적극 활용. 지적재산권 획득 기대
22	고려인삼 상용품종 9품종의 구별이 가능한 마커 조합 기술	보급 품종의 순도 유지 및 인삼 유통체계 확립에 도움이 될 것으로 기대, 고려인삼의 국제 경쟁력 확보에도 도움이 될 것으로 기대
23	고려인삼, 미국삼, 전칠삼 구별이 가능한 마커 개발 및 이를 이용한 인삼 가공 제품내의 기원 품종 판별 기술	가공제품내의 인삼 품종의 확인을 통한 인삼 시장의 투명화 및 고려인삼의 가치증대에 도움이 될 것으로 기대됨.
24	고함량 라이코펜 축적하고 오렌지색을 나타내는 배추 판별이 가능한 마커 개발 및 이용 기술	배추 육종 초기단계에서 오렌지색 내역을 갖는 배추형질의 조기 선발이 가능하여 효과적인 육종시스템 구축에 도움이 될 것으로 기대됨.
25	지부배추 유묘기 단백질 대량동정 기술	다양한 작물의 병저항성 및 내재해성 연구 기술로 활용될 수 있음

구분	핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
26	배추 건조 저항성 단백질체 동정을 통한 건조 저항성 관련 유전자 규명	형질전환 식물체 육성의 기초 자료로 활용될 수 있음
27	고함량 라이코핀 품종	확보된 품종개발능력을 활용하여 수출 가능한 우수한 품종을 개발하여 수출확대에 기여할 수 있고, 국내의 고기능성 품종개발수준을 높임
28	열대지역에서의 세대진전 체계 확립	확보된 세대진전 체계 및 경험을 활용하여 보다 빠르고 효율적인 고품질수박 품종개발에 활용하여 종자강국을 실현

다. 연구결과의 기술이전조건

핵심기술명	고추 TMV 저항성 L 유전자좌의 대립유전자 판별 마커 세트		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	50,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기	2016년
기술이전시 선행조건	농업기술실용화재단이 종자산업진흥센터를 민간육종연구단지내에 설립하고 대량 분자표지 분석서비스를 위한 제반설비를 갖추어야 함.		

3. 연구 성과 활용 계획

구 분	계 획
(1) 실용화,산업화 계획 (기술실시 등)	<ul style="list-style-type: none"> • 분자 마커 분석 및 생화학 성분 분석 지원 서비스 분야 : 서울대학교 식물유전체육종연구소와 협의를 거쳐서 마커 지원 시스템 및 생화학 성분 분석 서비스의 상용화(성분분석 서비스 상설 기구화) 추진 계획. • 고추 분자 마커 지원서비스 분야 <ol style="list-style-type: none"> ① 고추 분자육종에 필수적인, 일부 주요 형질연관 마커들을 SNP마커로 전환하여 대량분석 시스템을 구축하여 지속적인 서비스 추진. ② 현재 진행 중인 GSP, 채소종자사업단과 연계하여 매년 3,000점 정도의 지원서비스 진행 중이며 추가 연구비 확보시 지원서비스 확대. ③ 회사 자체적인 수익성 확보 및 지속적인 지원서비스를 위하여 연중 1,000점 이상 의뢰하는 경우 20% 할인된 가격으로 서비스 진행 중. ④ 종자산업진흥센터가 설립된 후에는 이미 실용화된 모든 분자 마커들을 기술이전하여 더 많은 중소기업들이 더 저렴한 가격으로 서비스 받을 수 있도록 적극 협조하되 반드시 마커 기술이전에 필요한 일정 비용을 종자산업진흥센터에서 부담해야 하며, 또한 분석서비스 진행에 따른 분석 점수별 별도의 로열티를 지불하여 개발자가 직접 서비스하여 만드는 수익성 부분을 보상할 수 있어야 함. • 고추 분자 마커 연구 분야 <ol style="list-style-type: none"> ① TMV 저항성 L locus 대립유전자 연관 마커 세트 및 당사가 이미 개발하여 서비스를 진행하고 있는 분자마커들에 대해서는 국내외 종자회사 및 서비스 관련기관을 대상으로 마커분석 서비스 및 기술이전 지속적으로 추진 예정. ② 매운맛 낮추는 LP 유전자 연관 마커를 개발하고, 이를 이용해 국내

구 분	계 획
	<p>외 각 종묘 회사에 분석 서비스 수행. 또한 관심 있는 회사를 대상으로 기술이전 실시 추진.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 고품량 라이코핀 수박 연구 분야 <ul style="list-style-type: none"> ① 기 개발된 4품종의 종자 국내 및 해외판매 ② 기 개발된 계통을 활용한 고부가가치 신품종육성
(2) 교육,지도,홍보 등 기술확산 계획	<ul style="list-style-type: none"> • 벼 식미 마커 연구 분야 <ul style="list-style-type: none"> : 마커 셀과 분석 방법을 벼 육종연구기관에 기술 전수할 예정임. • 생화학 성분 분석 분야 <ul style="list-style-type: none"> : 민간육종기관, 대학 연구실 등에서 분석기술에 대한 기술전수요구가 있으면 기술을 전수할 예정임. • 고추 분자 마커 분야 <ul style="list-style-type: none"> : 현재 TMV 저항성이 약한 것으로 알려진 중국용 우각초 및 해외 신 품종 개발에 L 구별 마커 세트 및 당사의 분자마커를 적극적으로 활용할 계획임. 이를 통해 TMV 저항성은 물론 고추 분자육종 전략을 수립/지도하고 기술 확산을 기대. • 고품량 라이코핀 수박 연구 분야 <ul style="list-style-type: none"> ① 고품량라이코핀 수박의 국내 및 해외주산지에 시교활동 및 홍보 ② 이마트 등 소매유통업체에 품종소개 및 판매독려
(3) 특허, 품종, 논문 등 지식 재산권 확보 계획	<ul style="list-style-type: none"> • 벼 마커 개발 분야 <ul style="list-style-type: none"> : 식미 관여 마커 P5, 당질배유 유전자 등의 분석 완료 후 논문과 특허를 출원할 예정임. • 고추 분자 마커 분야 <ul style="list-style-type: none"> : 사후 관리를 위해 L 구별 마커 특허 등록을 추진하고, LP마커 특허 출원 및 논문발표, 매운맛 높이는 것 유전분석 논문을 발표할 계획임. • 고품량 라이코핀 수박 연구 분야 <ul style="list-style-type: none"> : 리코스위트2호, 리코후레쉬1호, 리코후레쉬2호에 대한 품종보호등록 추진
(4) 추가연구, 타연구에 활용 계획	<ul style="list-style-type: none"> • 벼 식미 마커 연구 분야 <ul style="list-style-type: none"> : 추가적으로 식미 마커 및 관여 유전자를 발굴하여 세계 최고의 식미 품종 개발을 위한 기본 자료로 활용. • 생화학 성분 분석 분야

구 분	계 획
	<p>: 식물생리/육종분야의 최근 첨단 연구분야인 plant metabolomics 연구에 본 과제로 확립한 분석기술 및 know-how를 활용할 예정임.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 고추 분자 마커 분야 <ol style="list-style-type: none"> ① 매운맛 낮추는 LP 유전자와 30cM 정도 연관된 현재의 마커를 기초로 보다 가까운 마커를 집중적으로 개발함. 또한 minor QTL에 위치한 2개의 분자마커를 활용해 주동 마커 개발 후 표현형과 연관성을 조사할 계획임. ② 본 연구를 통하여 개발된 분자표지 및 당사((주)고추와 육종)가 이미 개발한 모든 분자표지들을 이용한 고추의 분자유종 시스템을 확립하여 차세대바이오그린21사업이나 GSP사업단에 활용함으로써 육종효율 증진 및 종자산업 국제경쟁력 확보 노력. • 배추 분자 마커 분야 <ol style="list-style-type: none"> ① 배추 카로티노이드 생합성 관련 유전자군의 정보는 십자화과 및 인삼 카로티노이드 생합성 경로 연구에 활용할 계획임. ② 건조 저항성 후보 유전자 리스트를 작물 내재해성 연구자에게 제공할 것이며, 후보 유전자를 벼에서 과발현하는 형질전환체를 육성하여 벼 기후변화 대응 GMO 개발 연구에서 활용할 것임.
(5) 기타 계획	<ul style="list-style-type: none"> • 고추 분자 마커 분야 <ol style="list-style-type: none"> ① 매운맛 높이는 주동 유전자 연관 마커 개발 ② 본 연구를 통하여 개발된 분자표지 및 당사((주)고추와 육종)가 이미 개발한 모든 분자표지들은 농업기술실용화재단이 추진하고 있는 종자진흥센터가 설립될 경우 기술이전을 통하여 선급기술료 및 분석서비스에 따른 로열티 확보가 가능할 것이며, 사용자의 입장에서는 저렴한 가격에 대량분석 함으로써 육종효율을 높이는데 크게 기여할 것으로 판단됨. • 인삼 분자 마커 분야 <p>: 인삼 품종 구별 마커는 종자 순도 검정, 제품의 원품종 검정에 활용될 계획임.</p> • 고품량 라이코펜 수박 연구 분야 <p>: 개발된 계통 및 품종을 채소종자수출사업(GSP)과 연계하여 종자의 해외수출에 활용</p> • 민간육종지원단지에 계획중인 육종지원센터의 서비스 구축에 필요시 본 사업의 분자마커 및 성분분석 지원서비스 노하우를 전수할 예정임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum* (Stellari, et. al., 2010)

Pun1은 고추의 매운맛 유무를 결정하는 유전자로 알려져 있음. 과 에서 Pun1에 돌연변이가 생겨 맵지 않은 고추의 유전형은 *Capsicum annuum* 은 pun1, *Capsicum chinense*는 pun1²로 불림. 본 연구자는 *C. frutescens*와 *C. chacoense*에서 매운맛 유무를 결정하는 유전자가 Pun1과 어떤 관계가 있는지를 조사함. *C. frutescens* 의 매운맛 유무는 Pun1 마커와 공분리하였고, *C. frutescens* 가운데 매운맛이 없는 자원의 유전형을 pun1³로 명명함. pun1³ 는 pun1 과 pun1²와 다르게 Pun1 유전자에 null mutation이 있어 전사체가 만들어지지 않는 경우이고, pun1 과 pun1²와는 대립관계에 있다고 보고함. 그러나 *C. chacoense* PI260433의 맵지 않은 유전형인 pun2는 Pun1과 대립관계가 아니라고 보고함. 이를 통해 매운맛 함량과 연관된 다른 유전자의 존재 가능성을 시사함.

2. 일본에서 보유중인 Chromosome segment substitution line (CSSL) 분양 및 정보 요청

현재 일본에서 개발, 보유중인 네 개의 CSSL 집단의 종자 분양 및 정보를 제공받아 연구에 사용하였다. CSSL 집단은 고시히카리/니폰바레//고시히카리, 고시히카리/*2 니폰바레, 고시히카리/IR64//고시히카리, 고시히카리/*2 IR64 로 구분되어 있으며, 각 집단마다 약 40개의 line을 유지하는 중이다. 각 line의 유전형에 대한 정보를 함께 제공받기 때문에, 이 유전자원은 추후 고시히카리, IR64 특이적인 유전자 위치 및 효과 분석에 유용하게 쓰일 수 있고, 원하는 line에 여교배를 함으로써 더욱 다양한 목적을 충족시킬 수 있는 집단을 새롭게 만들어 낼 수도 있을 것이라 기대한다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

NTIS에 등록된 고가(삼천만원 이상)의 연구 장비가 없어 해당 사항 없음.

제 8 장 참고문헌

- Björkman, M., Klingen, I., Birch, A. N., Bones, A. M., Bruce, T. J., Johansen, T. J., Meadow, R., Mølmann, J., Seljåsen, R., Smart, L. E., and Stewart, D. (2011). Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health - Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*, 72(7), 538-556.
- Broeckling, C. D., Huhman, D. V., Farag, M. A., Smith, J. T., May, G. D., Mendes, P., ... & Sumner, L. W. (2005). Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 56(410), 323-336.
- Burow, M., Müller, R., Gershenzon, J., and Wittstock, U. (2006). Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*. *Journal of chemical ecology*, 32(11), 2333-2349.
- Cai, Z., Cheung, C. Y., Ma, W. T., Au, W. M., Zhang, X. Y., and Lee, A. (2004). Determination of two intact glucosinolates in vegetables and Chinese herbs. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(3), 827-833.
- Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I., and Zagnoni, I. (2003). Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5226-5231.
- Chang, Y. H., & Ng, P. K. W. (2009). Extraction of ginsenosides from a blend of wheat flour and ginseng powder. *Food chemistry*, 115(4), 1512-1518.
- Chavan, U. D., Mckenzie, D. B., Amarowicz, R., and Shahidi, F. (2003). Phytochemical components of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food chemistry*, 81(1), 61-71.
- Chávez-Servín, J. L., Castellote, A. I., and López-Sabater, M. C. (2004). Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of chromatography A*, 1043(2), 211-215.
- Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., & Amati, A. (2005). Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of food composition and analysis*, 18(2), 121-130.

- Cho, Y. J., Kim, J. E., Chun, H. S., Kim, C. T., Kim, S. S., and Kim, C. J. (2003). Contents of resveratrol in different parts of grapes. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 35(2), 306–308.
- Choi, H. D., Park, Y. D., Park, Y. K., Kim, Y. S., & Chung, C. H. (2004). Effect of pretreatment conditions on γ -aminobutyric acid content of brown rice and germinated brown rice. *Korean Journal of Food Science and Technology*.
- Choi, S. Y., Cho, C. W., Lee, Y., Kim, S. S., Lee, S. H., & Kim, K. T. (2012). Comparison of Ginsenoside and Phenolic Ingredient Contents in Hydroponically-cultivated Ginseng Leaves, Fruits, and Roots. *Journal of ginseng research*, 36(4), 425.
- Choi, S. Y., Hong, H. D., Bae, H. M., Choi, C., & Kim, K. T. (2011). Phytochemical characteristics of coffee bean treated by coating of ginseng extract. *Journal of ginseng research*, 35(4), 436.
- Choung, M. G., Baek, I. Y., Kang, S. T., Han, W. Y., Shin, D. C., Moon, H. P., & Kang, K. H. (2001). Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(12), 5848–5851.
- Cocchi, M., Durante, C., Grandi, M., Lambertini, P., Manzini, D., & Marchetti, A. (2006). Simultaneous determination of sugars and organic acids in aged vinegars and chemometric data analysis. *Talanta*, 69(5), 1166–1175.
- Collison, M. W. (2008). Determination of total soy isoflavones in dietary supplements, supplement ingredients, and soy foods by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 91(3), 489.
- Cooke, D., Schwarz, M., Boocock, D., Winterhalter, P., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Marczylo, T. H. (2006). Effect of cyanidin 3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis—Relationship with tissue anthocyanin levels. *International journal of cancer*, 119(9), 2213–2220.
- Creasy, L. L., and Creasy, M. T. (1998). Grape chemistry and the significance of resveratrol: an overview. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, 36(Supplement 1), 8–13.
- Crespo, P., Bordonaba, J. G., Terry, L. A., and Carlen, C. (2010). Characterisation of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. *Food chemistry*, 122(1), 16–24.
- de Quirós, A., Lage-Yusty, M. A., & Lopez-Hernandez, J. (2009). HPLC analysis of organic acids using a novel stationary phase. *Talanta*, 78(2), 643–646.
- Erbaş, M., Kemal Uslu, M., Ozgun Erbaş, M., & Certel, M. (2006). Effects of fermentation and storage on the organic and fatty acid contents of tarhana, a Turkish fermented cereal food. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 294–301.
- EunSeob, Y., HeeDong, K., & YongHo, K. (2008). Variation of anthocyanin contents

- according to collection site and maturity in black soybean. *Korean Journal of Crop Science/Hanguk Jakmul Hakhoe Chi*, 53(4), 376–381.
- Ey gh -Bickong, H. A., Alexandersson, E. O., Gouws, L. M., Young, P. R., & Vivier, M. A. (2012). Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries. *Journal of Chromatography B*, 885, 43–49.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., and Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5–51.
- Feng, H., Li, Y., Liu, Z. and Liu, J. (2012) Mapping of *or*, a gene conferring orange color on the inner leaf of the Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Mol Breeding* 29, 235–244.
- Feng, S. L., Hu, F. D., Zhao, J. X., Liu, X., Li, Y. (2006). Determination of eleutheroside E and eleutheroside B in rat plasma and tissue by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and photodiode array detection., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62, 315–320
- Flamini, R. (2003). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(4), 218–250.
- Flores, P., Hell n, P., & Fenoll, J. (2012). Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 132(2), 1049–1054.
- Gorissen, A., Kraut, N. U., de Visser, R., de Vries, M., Roelofsen, H., and Vonk, R. J. (2011). No *de novo* sulforaphane biosynthesis in broccoli seedlings. *Food Chemistry*, 127(1), 192–196.
- G rb z, O., G cmen, D., Dag delen, F., G rsoy, M., Aydin, S.,  ahin,  ., B y kuysal, L., and Usta, M. (2007). Determination of *flavan-3-ols* and *trans-resveratrol* in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100(2), 518–525.
- Hee-Bum Yang, H-B., Liu, W-y., Kang, W-H., Kim, J-H., Cho, H.J., Yoo, J-H. and Kang, B-C. 2012. Development and validation of L allele-specific markers in Capsicum. *Mol. Breeding* 30:819 - 829.
- Hillebrand, S., Naumann, H., Kitzinski, N., K hler, N., & Winterhalter, P. (2009). Isolation and characterization of anthocyanins from blue-fleshed potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food chemistry*, 3(1), 96–101.
- Hong, E., Kim, S. J., and Kim, G. H. (2011). Identification and quantitative determination of glucosinolates in seeds and edible parts of Korean Chinese cabbage. *Food Chemistry*, 128(4), 1115–1120.
- Hong, S. B., Lee, S. J., Kim, Y. H., Hwang, Y. S., Yoon, K. H., Lee, S. I., ... & Choung, M. G. (2010). Variation of Anthocyanin, and Isoflavone Contents in Korean Black Soybeans Grown at Different Latitudinal Locations. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 29.

- Hu† , Y., Liang† , H., Yuan, Q., and Hong, Y. (2010). Determination of glucosinolates in 19 Chinese medicinal plants with spectrophotometry and high-pressure liquid chromatography. *Natural product research*, 24(13), 1195–1205.
- Iwaki, K., & Kitada, Y. (2007). Availability of partially milled rice as a daily source of γ -aminobutyric acid. *Food science and technology research*, 13(1), 41–44.
- Jannoey, P., Niamsup, H., Lumyong, S., Suzuki, T., Katayama, T., & Chairote, G. (2010). Comparison of gamma-aminobutyric acid production in Thai rice grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 257–263.
- Jin, X., Zhu, L. Y., Shen, H., Xu, J., Li, S. L., Jia, X. B., ... & Yan, R. (2012). Influence of sulphur-fumigation on the quality of white ginseng: A quantitative evaluation of major ginsenosides by high performance liquid chromatography. *Food chemistry*, 135(3), 1141–1147.
- Jones, D. L. (1998). Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and soil*, 205(1), 25–44.
- Jung, S., Murphy, P. A., & Sala, I. (2008). Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food chemistry*, 111(3), 592–598.
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., & Başer, K. H. C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 732–736.
- Kagan, I. A., Coe, B. L., Smith, L. L., Huo, C. J., Dougherty, C. T., & Strickland, J. R. (2008). A validated method for gas chromatographic analysis of γ -aminobutyric acid in tall fescue herbage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5538–5543.
- Kang, H. I., Kim, J. Y., Kwon, S. J., and Park, K. W. (2010). Antioxidative effects of peanut sprout extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39.
- Kang, H. I., Kim, J. Y., Park, K. W., Kang, J. S., Choi, M. R., Moon, K. D., and Seo, K. I. (2010). Resveratrol content and nutritional components in peanut sprouts. *Korean J Food Preserv*, 17, 384–390.
- Kang, J. S., Linh, P. T., Cai, X. F., Kim, H. S., Lee, J. J., & Kim, Y. H. (2001). Quantitative determination of eleutheroside B and E from *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography. *Archives of pharmacal research*, 24(5), 407–411.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187–192.
- Kim, E. O., Oh, J. H., Lee, K. T., Im, J. G., Kim, S. S., Suh, H. S., & Choi, S. W. (2008). Chemical compositions and antioxidant activity of the colored rice cultivars. *Korean J Food Preserv*, 15, 118–124.
- Kim, H. B., Kim, J. B., Kim, S. L., Koh, S. H., Seok, Y. S., Kim, Y. S., Sung, G. B., and Kang, P. D. (2011). Quantitative Analysis of Resveratrol in Mulberry Leaves. *Korean*

- Kim, H.J., Han, J-H., Yoo, J.H., Cho, H.J. and Kim, B-D. 2008. Development of a Sequence Characteristic Amplified Region Marker linked to the L4 Locus Conferring Broad Spectrum Resistance to Tobamoviruses in Pepper Plants. *Mol. Cells*, Vol. 25, No. 2, pp. 205-210.
- Kim, J., Hong, S. B., Jung, W. S., Yu, C. Y., Ma, K. H., Gwag, J. G., & Chung, I. M. (2007). Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rice and vegetable soybean varieties. *Food chemistry*, 102(3), 738-744.
- Kim, J. K., Chu, S. M., Kim, S. J., Lee, D. J., Lee, S. Y., Lim, S. H., Ha, S. H., Kweon, S. J., & Cho, H. S. (2010). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Food chemistry*, 119(1), 423-428.
- Kim, S. H., Kwon, T. W., Lee, Y. S., Choung, M. G., & Moon, G. S. (2005). A major antioxidative components and comparison of antioxidative activities in black soybean. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 37.
- Kim, S. L., Kim, H. B., Chi, H. Y., Park, N. K., Son, J. R., Yun, H. T., & Kim, S. J. (2005). Variation of anthocyanins and isoflavones between yellow-cotyledon and green-cotyledon seeds of black soybean. *Food Science and Biotechnology*, 14.
- Ko, J. H., Huang, H., Kang, G. W., and Cheong, W. J. (2005). Simultaneous quantitative determination of monosaccharides including fructose in hydrolysates of yogurt and orange juice products by derivatization of monosaccharides with p-aminobenzoic acid ethyl ester followed by HPLC. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY*, 26(10), 1533.
- Kubola, J., Siriamornpun, S., and Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food chemistry*, 126(3), 972-981.
- Kusano, M., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Jonsson, P., Moritz, T., ... & Saito, K. (2007). Application of a metabolomic method combining one-dimensional and two-dimensional gas chromatography-time-of-flight/mass spectrometry to metabolic phenotyping of natural variants in rice. *Journal of Chromatography B*, 855(1), 71-79.
- Kwon, Y. J., Lee, K. T., Yun, T. M., & Choi, S. W. (2004). Effect of heat pretreatment on the functional constituents of rice germ. *Journal of Food Science and Nutrition*, 9(4), 330-335.
- Lee, K. C., Cheuk, M. W., Chan, W., Lee, A. W. M., Zhao, Z. Z., Jiang, Z. H., and Cai, Z. (2006). Determination of glucosinolates in traditional Chinese herbs by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 386(7-8), 2225-2232.
- Lee, M. J., Cheong, Y. K., Park, K. H., Doo, H. S., Suh, D. Y., and Kim, H. S. (2003). trans-Resveratrol content of varieties and growth period in peanut. *Korean Journal of Crop Science*, 48.
- Lee, S. J., Ahn, J. K., Kim, S. H., Kim, J. T., Han, S. J., Jung, M. Y., & Chung, I. M.

- (2003). Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3382–3389.
- Lee, S. J., Yan, W., Ahn, J. K., & Chung, I. M. (2003). Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. *Field Crops Research*, 81(2), 181–192.
- Lee, S. J., Kim, J. J., Moon, H. I., Ahn, J. K., Chun, S. C., Jung, W. S., ... & Chung, I. M. (2008). Analysis of isoflavones and phenolic compounds in Korean soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds of different seed weights. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(8), 2751–2758.
- Lee, S. J., Seguin, P., Kim, J. J., Moon, H. I., Ro, H. M., Kim, E. H., ... & Chung, I. M. (2010). Isoflavones in Korean soybeans differing in seed coat and cotyledon color. *Journal of food composition and analysis*, 23(2), 160–165.
- Lee, Y. R., Koh, H. J., Nam, S. H., Kang, M. Y., & Chin, J. H. (2004). Screening of Physiological Functionality of Germinated Giant Embryonic Rices. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 47.
- Lestari, P., Ham, T. H., Lee, H. H., Woo, M. O., Wenzhu Jiang, Chu, S. H., Kwon, S. W., Ma, K, Lee, J.H., Cho, Y. C. and Koh, H. J. (2009). PCR Marker-Based Evaluation of the Eating Quality of Japonica Rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 57(7), 2754 - 2762.
- Liang, H., Yuan, Q. P., Dong, H. R., and Liu, Y. M. (2006). Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of food Composition and Analysis*, 19(5), 473–476.
- Li, H., Cho, J. Y., Gao, T. C., Choi, C. R., Lee, K. D., Cho, J. E., ... & Ham, K. S. (2008). Increment of physiologically active compounds in germinated brown rice treated with chitosan and its effect on obesity of rat fed a high fat diet. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37.
- Lim, S. D., Kim, K. S., & Do, J. R. (2009). Physiological Characteristics and GABA Production of *Lactobacillus acidophilus* RMK567 Isolated from Raw Milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 29(1), 15–23.
- Linderborg, K., Laaksonen, O., Kallio, H., and Yang, B. (2011). Flavonoids, sugars and fruit acids of alpine bearberry (*Arctostaphylos alpina*) from Finnish Lapland. *Food Research International*, 44(7), 2027–2033.
- Lin, L. Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., & Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano *Lippia graveolens* by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of food composition and analysis*, 20(5), 361–369.
- Liu, C., Wang, L., Wang, J., Wu, B., Liu, W., Fan, P., Liang, Z., and Li, S. (2013). Resveratrols in *Vitis* berry skins and leaves: Their extraction and analysis by HPLC. *Food chemistry*, 136(2), 643–649.
- Liu, E. H., Qi, L. W., Cao, J., Li, P., Li, C. Y., & Peng, Y. B. (2008). Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids.

Molecules, 13(10), 2521–2544.

- Ma, B., Zhang, Q., Liu, Y., Li, J., Xu, Q., Li, X., ... & Ying, H. (2013). Simultaneous determination of Eleutheroside B and Eleutheroside E in rat plasma by high performance liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 917, 84–92.
- Ma, Y. C., Wang, X. Q., Hou, F. F., Ma, J., Luo, M., Lu, S., Jin, P., Chen, A., Xu, I., Patel, A. V., Gorechki, D. (2011) Simultaneous quantification of polyherbal formulations containing *Rhodiola rosea* L. and *Eleutherococcus senticosus* Maxim. using rapid resolution liquid chromatography (RRLC). *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 55, 908–915.
- Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., & Gil, M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3861–3869.
- Materska, M., Piacente, S., Stochmal, A., Pizza, C., Oleszek, W., & Perucka, I. (2003). Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry*, 63(8), 893–898.
- Materska, M., & Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1750–1756.
- Matsumoto, E., Yasui, C., Ohi, M. and Tsukada, M. (1998) Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) *Euphytica* 104, 79–86.
- Matsunaga, H., Saito, T., Hirai, M., Nunome, T. and Yoshida, T. (2003). DNA markers linked to pepper mild mottle virus (PMMoV) resistant locus (L4) in *Capsicum*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72(3):218–220.
- Matthäus, B., and Luftmann, H. (2000). Glucosinolates in members of the family Brassicaceae: separation and identification by LC/ESI-MS-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2234–2239.
- Miean, K. H., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 3106–3112.
- MyoungGun, C. (2008). Optimal HPLC condition for simultaneous determination of anthocyanins in black soybean seed coats. *Korean Journal of Crop Science/Hanguk Jakmul Hakhoe Chi*, 53(4), 359–368.
- Njumbe Ediage, E., Diana Di Mavungu, J., Scippo, M. L., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van Peteghem, C., and De Saeger, S. (2011). Screening, identification and quantification of glucosinolates in black radish (*Raphanus sativus* L. *niger*) based dietary supplements using liquid chromatography coupled with a photodiode array and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4395–4405.
- Nour, V., Trandafir, I., and Ionica, M. E. (2010). HPLC Organic Acid Analysis in Different

- Citrus Juices under Reversed Phase Conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1).
- Padilla, G., Cartea, M. E., Velasco, P., de Haro, A., and Ordás, A. (2007). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry*, 68(4), 536–545.
- Pae, S. B., Ha, T. J., Lee, M. H., Hwang, C. D., Shim, K. B., Park, C. H., Park, K. Y., and Baek, I. Y. (2011). Evaluation of characteristics of peanut sprout using Korean cultivars. *Korean Journal of Crop Science/Hanguk Jakmul Hakhoe Chi*, 56(4), 394–399.
- Park, H. W., In, Gyo, Han, S. T., Lee, M. W., Kim, S. Y., Kim, K. T., Cho, B. G., Han, G. H., Chang, I. M. (2013). Simultaneous determination of 30 ginsenosides in panax ginseng preparations using ultra performance liquid chromatography. *J Ginseng Res.*, 37(4), 457–467.
- Park, Y. W., & Lee, J. H. (2006). Effect of freezing on organic acid contents and lipolytic index of plain soft and Monterey Jack goat milk cheeses. *Small ruminant research*, 63(1), 58–65.
- Pietta, P. G., Mauri, P. L., Manera, E., Ceva, P. L., & Rava, A. (1989). An improved HPLC determination of flavonoids in medicinal plant extracts. *Chromatographia*, 27(9–10), 509–512.
- Piñeiro, Z., Palma, M., and Barroso, C. G. (2006). Determination of *trans*-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1110(1), 61–65.
- Puchades, R., Herrero, M. A., Maquieira, A., & Atienza, J. (1991). Simultaneous enzymatic determination of 1 (–) malic acid and 1 (+) lactic acid in wine by flow injection analysis. *Food chemistry.*, 42(2), 167–182.
- Rebelein, H. (1961). Colorimetric determination of tartaric and lactic acids in wine and fruit juice. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.*, 57, 36–41.
- Ren, D. M., Qu, Z., Wang, X. N., Shi, J., & Lou, H. X. (2008). Simultaneous determination of nine major active compounds in *Dracocephalum rupestre* by HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 48(5), 1441–1445.
- Rochfort, S. J., Trenerry, V. C., Imsic, M., Panozzo, J., and Jones, R. (2008). Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MS *n* fragmentation. *Phytochemistry*, 69(8), 1671–1679.
- Roohinejad, S., Mirhosseini, H., Saari, N., Mustafa, S., Alias, I., Hussin, A. S. M., ... & Manap, M. Y. (2009). Evaluation of GABA, crude protein and amino acid composition from different varieties of Malaysian's brown rice. *Australian journal of crop science*, 3(4).
- Rudolf, J. L., Resurreccion, A. V. A., Saalia, F. K., and Phillips, R. D. (2005). Development of a reverse-phase high-performance liquid chromatography method for analyzing *trans*-resveratrol in peanut kernels. *Food chemistry*, 89(4), 623–638.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous

- determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571–581.
- Scherer, R., Rybka, A. C. P., Ballus, C. A., Meinhart, A. D., & Godoy, H. T. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*, 135(1), 150–154.
- Sesta, G. (2006). Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apidologie*, 37(1), 84–90.
- Shao, S., Duncan, A. M., Yang, R., Marcone, M. F., Rajcan, I., & Tsao, R. (2011). Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products. *Food Research International*, 44(8), 2425–2434.
- Shin, H. J., Kang, B. S., Ahn, J. B., and Kim, B. H. (2007). Isolation and purification of resveratrol from a grape twig. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 22.
- Shu, X. L., Frank, T., Shu, Q. Y., & Engel, K. H. (2008). Metabolite profiling of germinating rice seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11612–11620.
- Song, L., and Thornalley, P. J. (2007). Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of *Brassica* vegetables. *Food and chemical toxicology*, 45(2), 216–224.
- Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C., & Biliaderis, C. G. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry*, 80(2), 261–273.
- Stellari, G.M, Mazourek, M. and Jahn, M.M. 2010. Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. *Heredity* 104:460 - 471.
- Sugita, T., Yamaguchi, K., Sugimura, Y., Nagata, R., Yuji, K., Kinoshit, T. and Todoroki, A. 2004. Development of SCAR Markers Linked to L3 gene in *Capsicum*. *Breeding Science*. 54 : 111–115.
- Sun, B. S., Xu, M. Y., Li, Z., Wang, Y. B., & Sung, C. K. (2012). UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis for steaming times-dependent profiling of steamed *Panax quinquefolius* and its ginsenosides transformations induced by repetitious steaming. *Journal of ginseng research*, 36(3), 277.
- Švehlíková, V., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Needs, P. W., Piacente, S., Kroon, P. A., & Bao, Y. (2004). Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile *Chamomilla recutita* [L.] Rauschert. *Phytochemistry*, 65(16), 2323–2332.
- Tomita, R., Murai, J., Miura, Y., Ishihara, H., Liu, S., Kubotera, Y., Honda, A., Hatta, R., Kuroda, T., Hamada, H., Sakamoto, M., Munemura, I., Nunomura, O., Ishikawa, K., Genda, Y., Kawasaki, S., Suzuki, K., Meksem, K. and Kobayashi, K. 2008. Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene L3 of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly

- repetitive sequences. *Theor. Appl. Genet.* 117:1107 - 1118.
- Tormo, M., & Izco, J. M. (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A.*, 1033(2), 305-310.
- Truscott, R. J., Minchinton, I., and Sang, J. (1983). The isolation and purification of indole glucosinolates from Brassica species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(3), 247-254.
- Usenik, V., Fabčič, J., and Štampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 185-192.
- van Doorn, H. E., van Holst, G. J., van der Kruk, G. C., Raaijmakers-Ruijs, N. C., and Postma, E. (1998). Quantitative determination of the glucosinolates sinigrin and progoitrin by specific antibody ELISA assays in Brussels sprouts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(2), 793-800.
- Varanyanond, W., Tungtrakul, P., Surojanametakul, V., Watanasiritham, L., & Luxiang, W. (2005). Effect of water soaking on gammaaminobutyric acid (GABA) in germ of different Thai rice varieties. *Kasetsart J.(Nat. Sci)*, 39, 411-415.
- Visentin, M., Tava, A., Iori, R., and Palmieri, S. (1992). Isolation and identification for trans-4-(methylthio)-3-butenyl glucosinolate from radish roots (*Raphanus sativus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(9), 1687-1691.
- Wada, L., & Ou, B. (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberrries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3495-3500.
- Wang, A. Y., Kao, M. H., Yang, W. H., Sayion, Y., Liu, L.F., Lee, P. D. and Su, J. C. (1999). Differentially and developmentally regulated expression of three rice *sucrose synthase* genes. *Plant Cell Physiol.*, 40, 800-807.
- Wang, K. H., Lai, Y. H., Chang, J. C., Ko, T. F., Shyu, S. L., and Chiou, R. Y. Y. (2005). Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(2), 242-246.
- Wang, Y., Yang, L., He, Y. Q., Wang, C. H., Welbeck, E. W., Bligh, S. W., & Wang, Z. T. (2008). Characterization of fifty one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(12), 1767-1778.
- Wang, Z., Zhang, L., & Sun, Y. (2005). Semipreparative separation and determination of eleutheroside E in *Acanthopanax giraldii* Harms by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*, 43(5), 249-252.
- Watanabe, M., Musumi, K. and Ayugase, J. (2011) Carotenoid pigment composition, polyphenol content, and antioxidant activities of extracts from orange-colored Chinese cabbage. *LWT-Food Sci Technol* 44, 1971-1975.

- Yang, L., Ge, H. S., Wang, W. J., Zu, Y. G., Yang, F. J., Zhao, C. J., Zhang, L., Zhang, Y. (2013). Development of sample preparation method for eleutheroside B and E analysis in *Acanthopanax senticosus* by ionic liquid-ultrasound based extraction and high-performance liquid chromatography detection., *Food chemistry.*, 141, 2426-2433.
- YongHo, K., DongSeon, K., HyunHee, K., HeeSeon, K., & KwangOh, K. (2008). Antioxidant activity and cytotoxicity on human cancer cells of anthocyanin extracted from black soybean. *Korean Journal of Crop Science/Hanguk Jakmul Hakhoe Chi*, 53(4), 407-412.
- Yun, H. T., Kim, W. H., Lee, Y. H., Suh, S. J., & Kim, S. J. (2006). Isoflavone Contents of Soybean according to Different Planting Dates. *Korean Journal of Crop Science*, 51.
- Zhang, F., Wang, G., Wang, M., Liu, X., Zhao, X., Yu, Y., Zhang, D. and Yu, S. (2008) Identification of SCAR markers linked to *or*, a gene inducing β -carotene accumulation in Chinese cabbage. *Euphytica* 164, 463-471.
- Zhang, M. F., and Li, Z. L. (2005). A comparison of sugar-accumulating patterns and relative compositions in developing fruits of two oriental melon varieties as determined by HPLC. *Food chemistry*, 90(4), 785-790.
- Zhang, Z. F., Liu, Y., Luo, P., & Zhang, H. (2009). Separation and purification of two flavone glucuronides from *Erigeron multiradiatus* (Lindl.) Benth with macroporous resins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009.
- Zheng, J., Jin, Y., & Row, K. H. (2005). Analysis of isoflavones from Korean and Chinese soybean and processed products by HPLC. *JOURNAL-KOREAN CHEMICAL SOCIETY*, 49(4), 349.
- Zheng, Q. S., Sun, X. L., Xu, B., Li, G., & Song, M. (2005). Mechanisms of apigenin-7-glucoside as a hepatoprotective agent. *Biomed Environ Sci*, 18, 65-70.
- Zhu, Q., Ge, S. (2005). Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus *Oryza* revealed by intron sequences of four nuclear genes. *New Phytologist.*, 167, 249-265.
- 황은선. (2010). 연구논문: 배추 절임조건에 따른 Myrosinase 활성 및 Total Glucosinolates 함량 변화. *한국식품조리과학회지*, 26(1), 104-109.

별첨

- 별첨 4. 작물육종지원사업단 성분 분석법 표준화 SOP (Standard Operating Procedures) / 540
- 별첨 5. 식물 분자표지 이용 육종기술 교육훈련 평가 설문지 / 608
- 별첨 6. 작물육종지원사업단 지원 사업 설문지 / 610

※ 별첨 1. 연구개발 보고서, 2. 자체평가 의견서 3. 연구 개발 결과 활용 보고서는 온라인으로 제출.

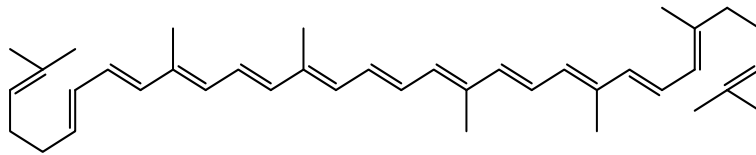
[별첨 4] 작물육종지원사업단

성분 분석법 표준화 SOP (Standard Operating Procedures)

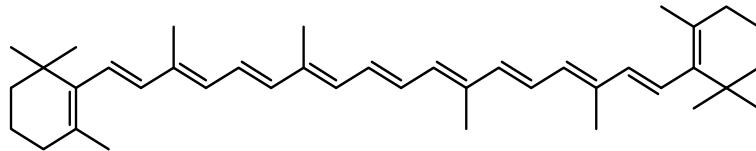
* 2009년부터 2014년까지 작물 품질 육종을 위해 확립된 기능성/생리활성 생화학 성분 분석 기술을 바탕으로 분석법의 표준분석지침서(SOP)를 마련하였다.

1. Carotenoids (lycopene 및 β -carotene) 성분 분석

(1) 분석물질 : Lycopene, β -carotene



Lycopene (C₄₀H₅₆)



β -carotene (C₄₀H₅₆)

(2) 시험작물 : 수박, 감귤, 토마토, 멜론, 호박 등 관련 작물

(3) Carotenoids 성분 분석법

(가) 시약 및 기구

- ① Analytical standard : Lycopene, β -carotene (Sigma)
- ② Methanol, hexane, acetone, ethanol : HPLC grade, Burdic & Jackson (USA)
Methyl-t-butyl-ether (MTBE) : HPLC grade, Honeywell
- ③ 50 ml tube, 100 ml round bottom flask, 2 ml & 20 ml amber vial
- ④ Shaker : VISON SCIENTIFIC co., LTD
- ⑤ Balance : AND HF-2000GD Balance (Japan)
- ⑥ Rotary evaporator : Buchi rotavapor R-114 (Switzerland)

(나) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Shimadzu-10Avp HPLC (KYOTO, Japan)
- ② Detector : Shimadzu SPD-10Avp (Wavelength : 476 nm)
- ③ Column : Shiseido C18 column (UG120, 250 X 4.60mm, 5 micron)
- Column oven temperature: 40 °C
- ④ Mobile phase
- Solvent A : Methyl-t-butyl-ether (MTBE)
- Solvent B : Methanol

- Gradient program

Time(min)	%A(MEOH)	%B(MTBE)
0	100	0
7	100	0
14	82	18
18	82	18
20	100	0
30	100	0

- ⑤ Flow rate : 1.2 ml/min
- ⑥ Injection volume : 10 μ l

(다) 검량선 작성

Lycopene과 β -carotene 각각 5 mg을 취해 chloroform 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 만들었다. 이 용액을 MTBE 용액으로 단계적으로 희석하여 100, 50, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 10 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

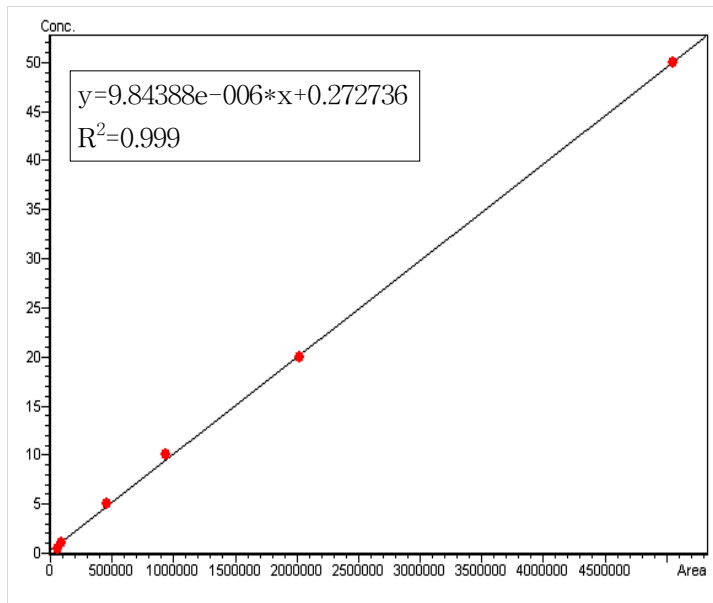
(라) 시료의 추출

시료 2g에 hexane : acetone : ethanol (2:1:1, v/v/v) 20 ml을 넣고 vortex mixer로 10초간 혼합 하였다. Tube를 shaker에 고정 후 250 rpm에서 10분간 추출하였다. 추출물에 10 ml의 물을 가하고 다시 5분 동안 혼합해주었다. 시료를 원심분리기로 4 $^{\circ}$ C 상태에서 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 하였다. 유기용매 층(상위 층)을 100 ml 용량의 플라스크에 옮기고 40 $^{\circ}$ C에서 감압 농축 하였다. 추출물에 MTBE 용액 10 ml로 용해시키고 0.2 μ m PTFE syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다. 각 시료는 3반복 추출하여 분석하였다.

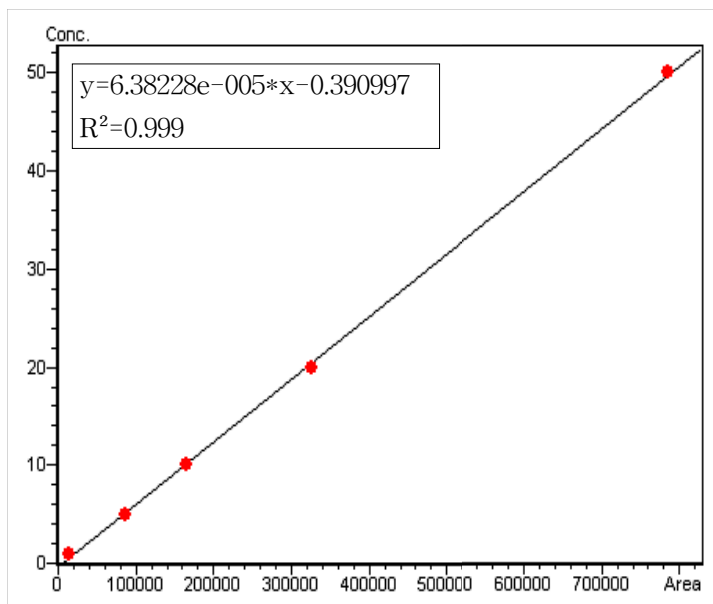
(4) 분석 결과

(가) 표준용액 검량선

① Lycopene

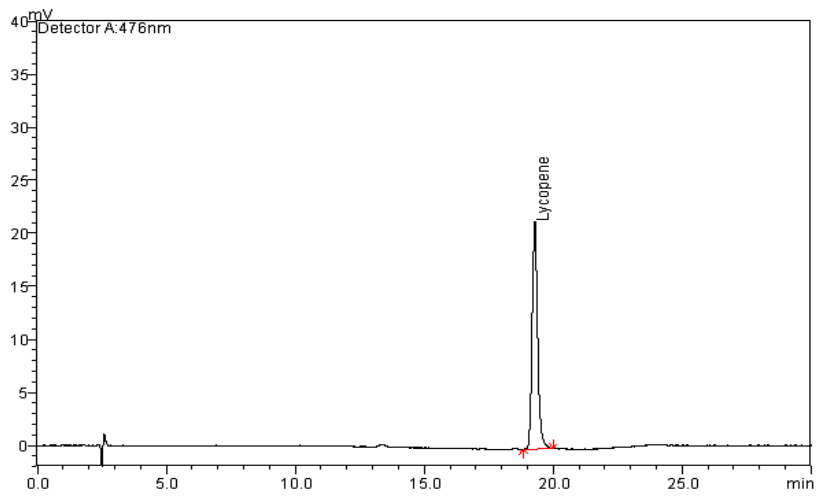


② β -carotene

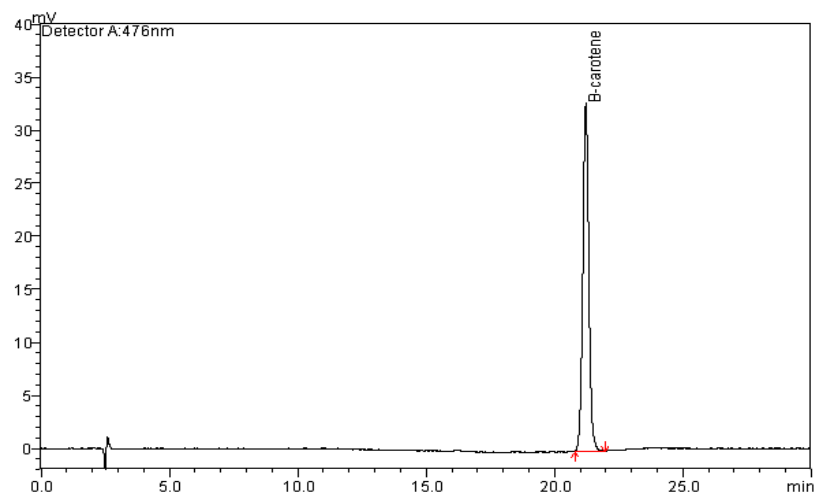


(나) 표준용액 분석 결과 크로마토그램

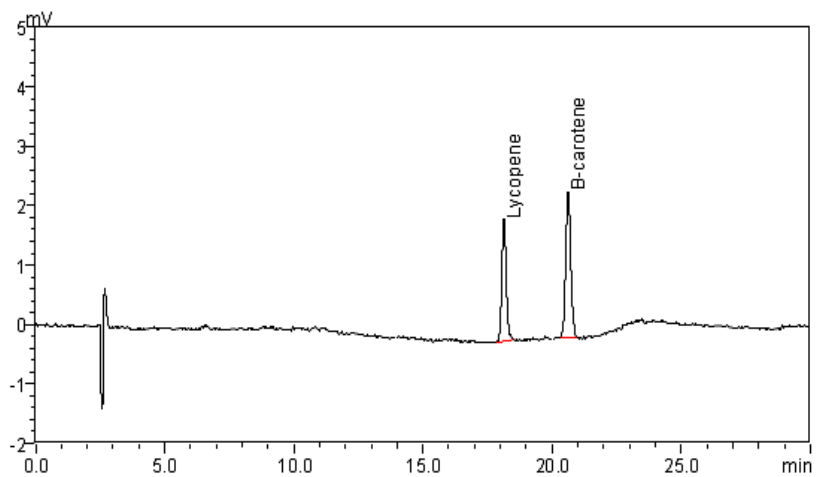
① Lycopene 표준용액(5ppm)의 크로마토그램



② β -carotene 표준용액(5ppm)의 크로마토그램

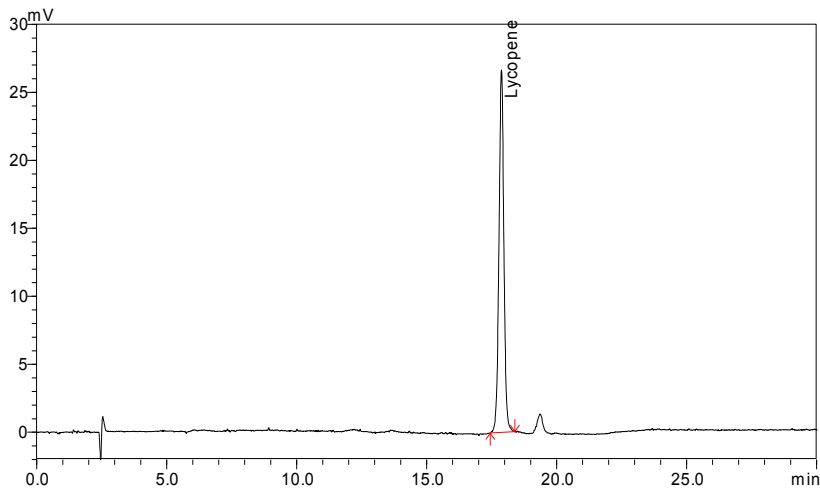


③ Lycopene & β -carotene 혼합표준용액(0.1ppm)의 크로마토그램

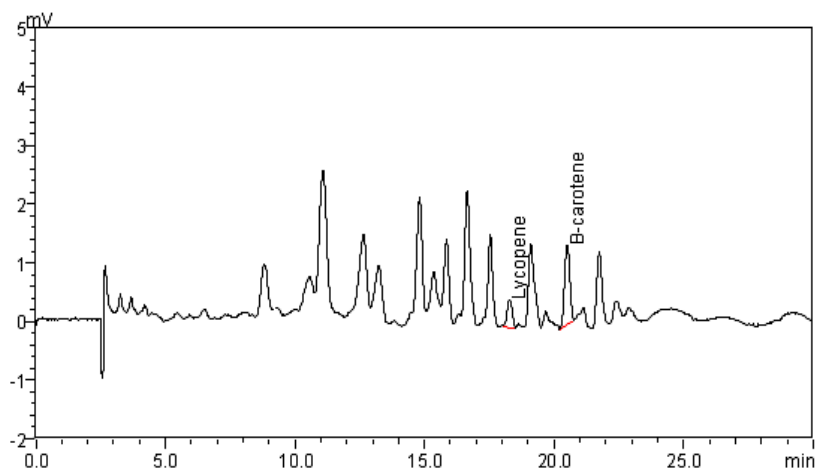


(다) 시료 분석 결과 크로마토그램

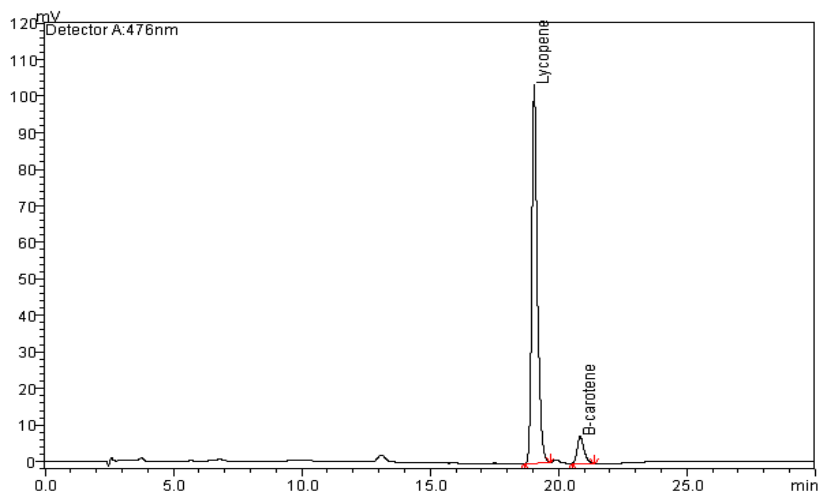
① 수박 시료



② 감귤 시료

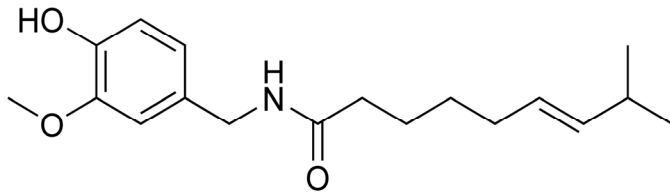


③ 토마토 시료

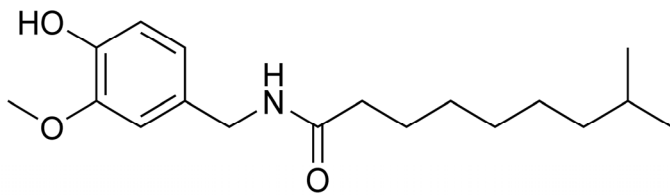


2. Capsaicinoids 성분 분석

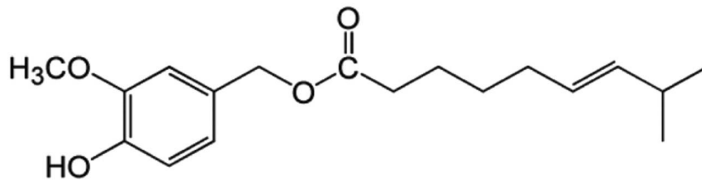
(1) 분석물질 : Capsaicinoids (Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate)



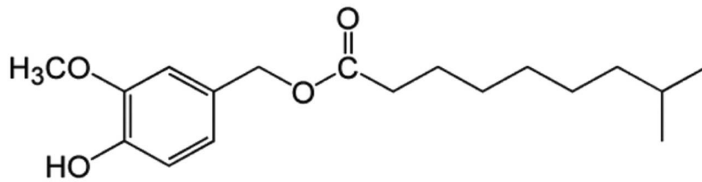
Capsaicin (C₁₈H₂₇NO₃)



Dihydrocapsaicin (C₁₈H₂₉NO₃)



Capsiate (C₁₈H₂₆O₄)



Dihydrocapsiate (C₁₈H₂₈O₄)

(2) 시험작물 : 고추, 파프리카 등

(3) Capsaicinoids 성분 분석 조건

(가) 시약 및 기구

① Analytical standard

- Capsaicin (97%), dihydrocapsaicin (88%); Sigma Chemical Co. (USA)
- Capsiate, dihydrocapsiate; Konectica (Cadiz, Spain)

② Methanol : HPLC grade, Burdic & Jackson (USA)

③ Balance : AND HM-200 Balance (Japan)

④ Centrifuge : Beckman Coulter, Allegra 6R (USA)

⑤ Shaker : Han-sung Lab Tech. (Korea)

(나) 분석기기 및 분석조건

① Instrument : Agilent 1100 series (USA)

② Detector : UV/VIS detector (Wavelength : 280nm)

③ Column : Phenomenex Luna C18 (250 × 4.6 mm, 5 micron)

- ④ Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Methanol
 - Isocratic program : 80% methanol isocratic
- ⑤ Flow rate : 1.0 ml/min
- ⑥ Injection volume : 20 μ l

(다) 검량선 작성

Capsaicin, dihydrocapsaicin, capsiate, dihydrocapsiate 각각 10mg을 취해 methanol 10 ml에 각각 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 만들었다. 이 용액을 methanol 용액으로 단계적으로 희석하여 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

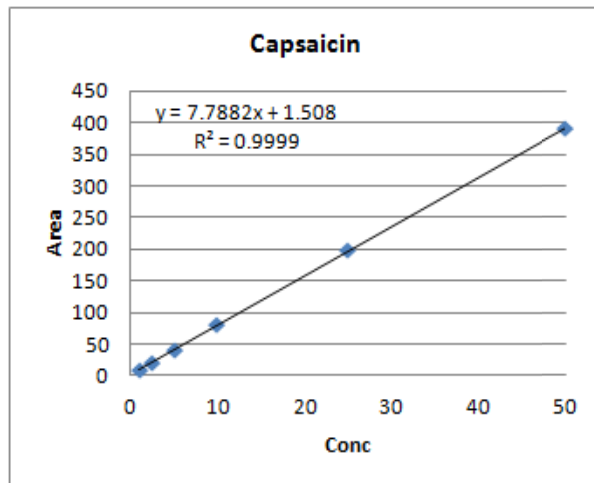
(라) 시료의 추출

고추 또는 고춧가루 1 g에 methanol 20 ml을 넣고 shaker에 고정 후 250 rpm에서 1시간 동안 추출하였다. 시료를 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 0.2 μ m PTFE syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 시료는 3반복 추출하였다.

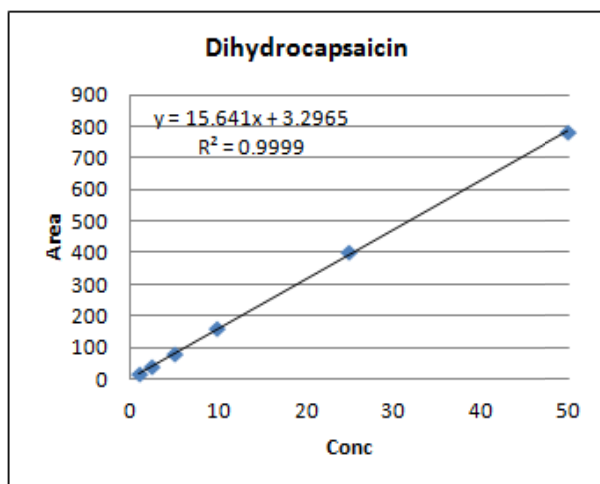
(4) 분석결과

(가) 표준용액 검량선

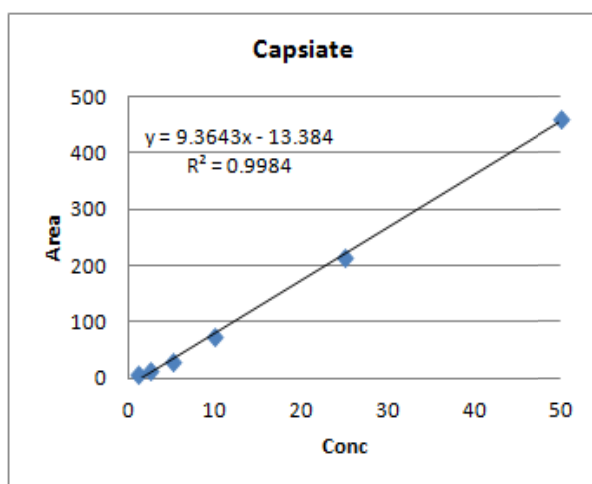
① Capsaicin



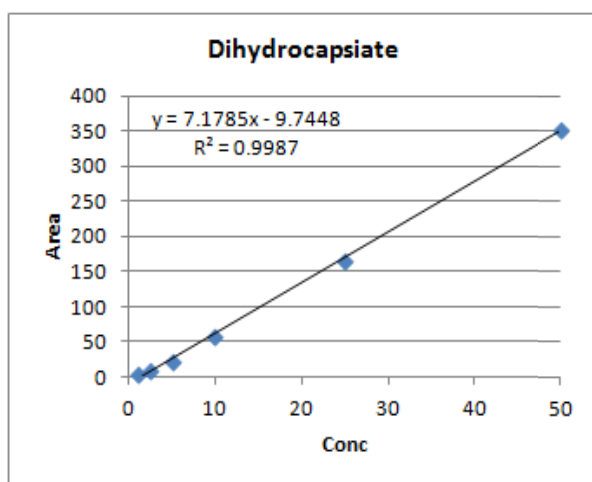
② Dihydrocapsaicin



③ Capsiate

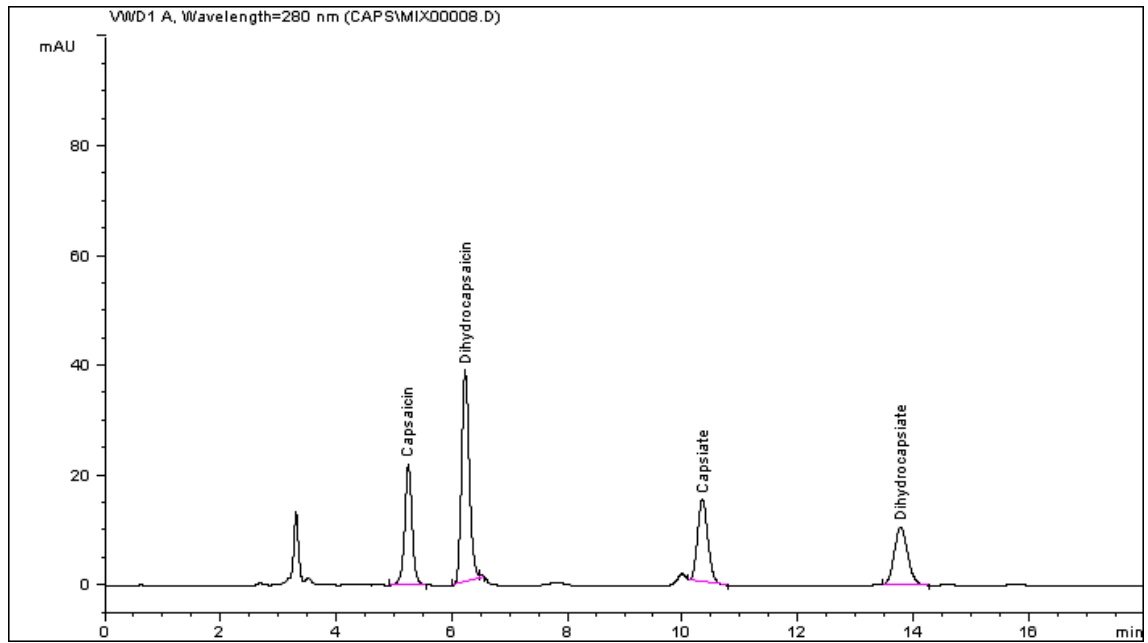


④ Dihydrocapsiate



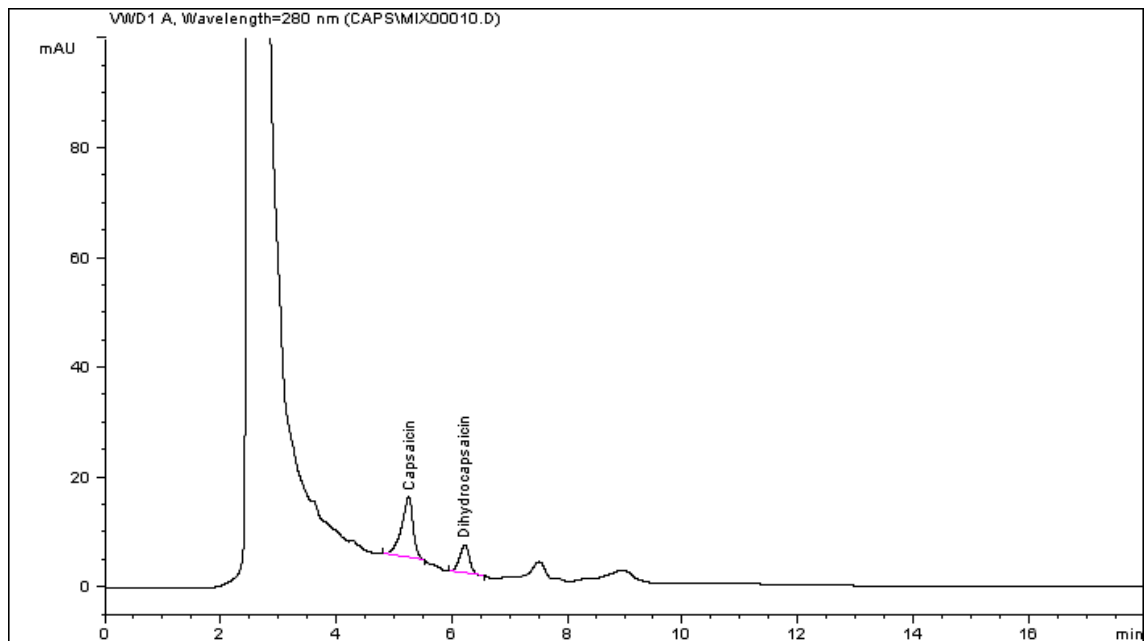
(나) 표준용액 크로마토그램

① Capsaicinoid (50ppm)



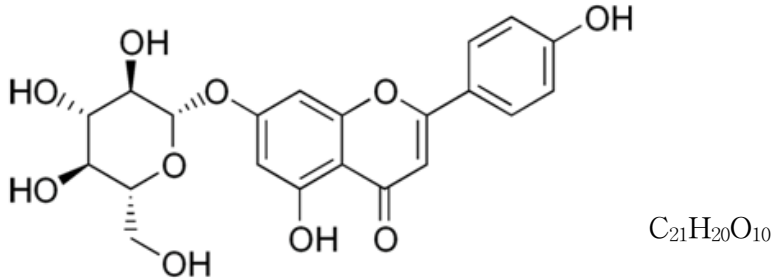
(다) 시료 분석 결과 크로마토그램

① 고춧가루



3. Apigenin-7-glucoside 성분 분석

(1) 분석물질 : Apigenin-7-glucoside (Apigetrin)



(2) 시험작물 : 파프리카, 고추

(3) Apigenin-7-glucoside 성분 분석법

(가) 시약 및 기구

- ① Analytical standard : Apigenin-7-glucoside (Apigetrin), 97.0% (HPLC), Sigma-aldrich.co.(USA)
- ② Methanol, Acetonitrile : HPLC grade, Burdick & Jackson (USA)
- ③ Balance : AND HM-200 Balance (Japan)
- ④ Micro High Speed Centrifuge : Micro 17TR (Korea)
- ⑤ TissueLyser II : Retsch, QIAGEN

(나) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Shimadzu HPLC (Japan)
- ② Detector : Shimadzu UV-VIS detector (Wavelength : 335nm)
- ③ Column : Shiseido C18 column (UG120, 250 × 4.6 mm, 5 micron)
- ④ Column oven temperature : 25°C
- ⑤ Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Acetonitrile
 - Gradient program

Time(min)	%A(DW)	%B(ACN)
0	90	10
5	80	20
10	70	30
15	65	35
20	40	60
22.5	0	100
25	0	100
27.5	90	10
35	90	10

⑦ Flow rate : 0.8 ml/min

⑧ Injection volume : 20 μ l

(다) 검량선 작성

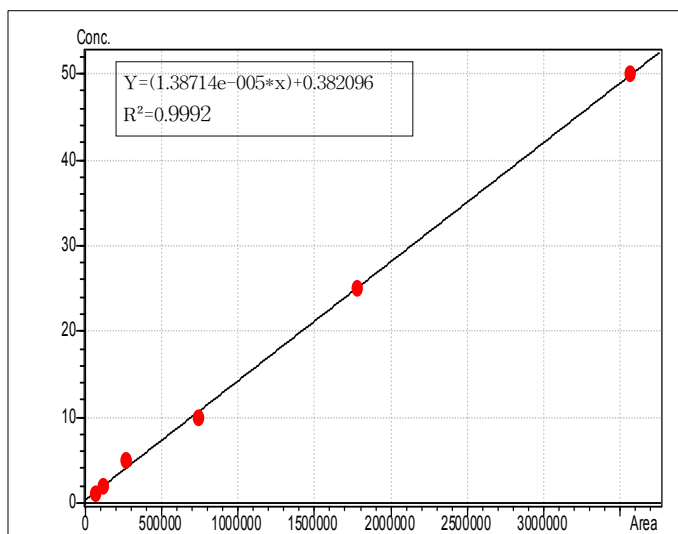
Apigenin-7-glucoside 표준품 10 mg을 methanol 10 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 methanol 10 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.3 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

(라) 시료의 추출

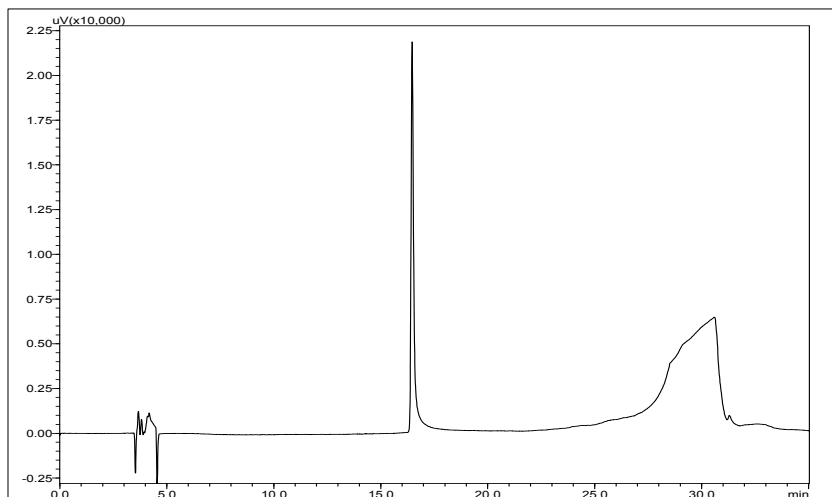
시료 50 mg에 methanol 1 ml을 가하고 TissueLyser II (Retsch)에서 1초당 20회씩 20분 동안 추출하였다. 13,000 g에서 20분간 원심분리 후 상등액을 0.2 μ m PVDF syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 HPLC로 분석하였다.

(4) 분석결과

(가) 표준용액 검량선

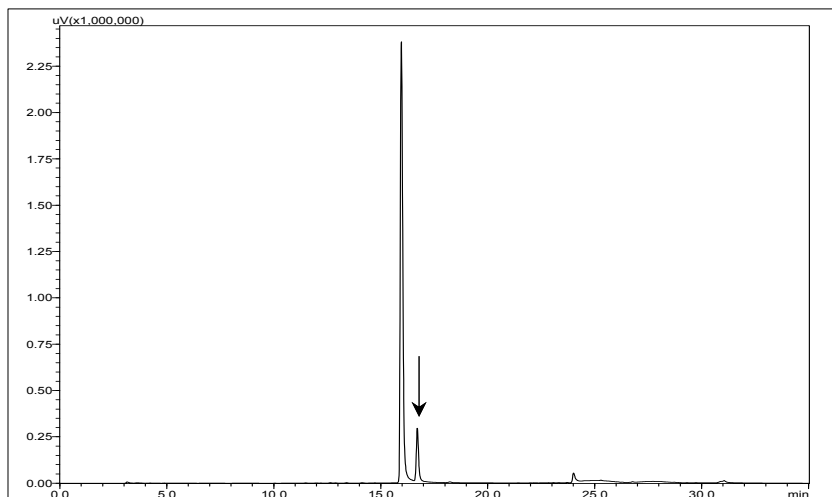


(나) Apigenin-7-glucoside 표준용액(5ppm) 크로마토그램

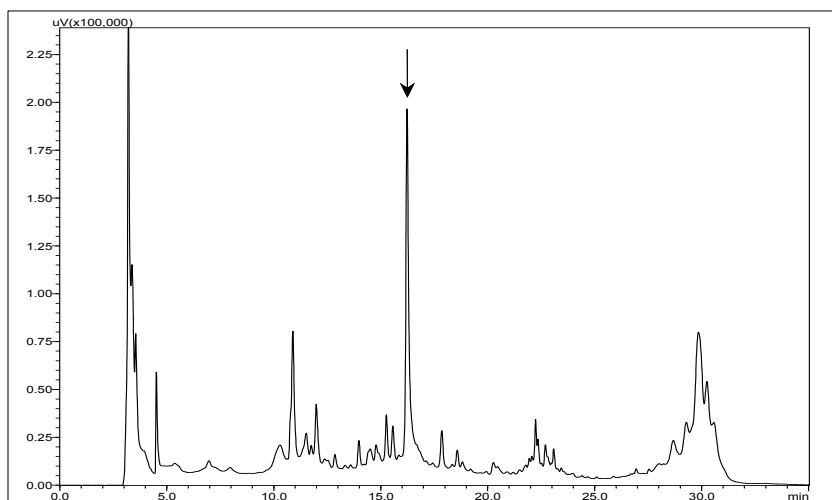


(다) 시료 분석결과 크로마토그램

① 파프리카 잎

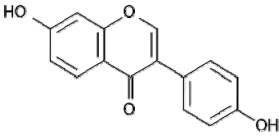
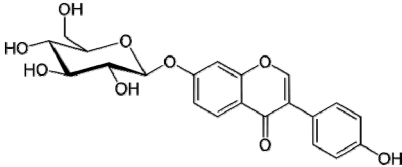
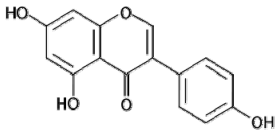
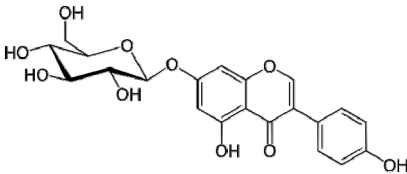
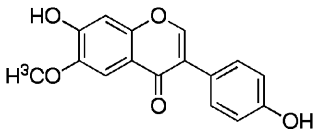
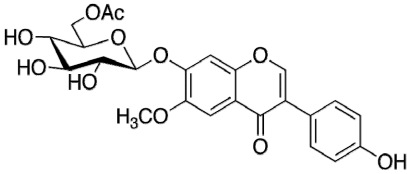
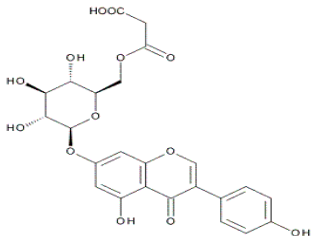


② 파프리카 과육



4. Isoflavone 성분 분석 (HPLC-UV)

(1) 분석물질 : Isoflavone 7종

비 배당체(Aglycone) 형태	배당체(Glycone) 형태
Daidzein	Daidzin
	
Genistein	Genistin
	
Glycitein	Glycitin
	
	Malonylgenistin
	

(2) 시험작물 : 콩, 콩나물 등

(3) Isoflavone 성분 분석법

(가) 시약 및 기구

① Analytical standard

Daidzein, genistein, glycitein, daidzin, genistin, glycitin; Sigma (USA)
malonylgenistin; Wako (Japan)

② Acetonitrile : HPLC grade, Burdic&Jackson (USA)

③ Acetic acid, DMSO : Sigma-aldrich (USA)

④ Shaker : VISON SCIENTIFIC co., LTD

⑤ Balance : AND Balance (Korea)

(나) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Shimadzu 10Avp HPLC
- ② Detector : UV/VIS detector (Wavelength : 254 nm)
- ③ Column : Luna C18 (Phenomenex, 250 X 4.60mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile + 0.1% acetic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% acetic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	15	85
2	15	85
20	25	75
40	40	60
45	100	0
50	15	85
60	15	85

- ⑤ Flow rate : 1.0 ml/min
- ⑥ Injection volume : 20 μ l

(다) 검량선 작성

Isoflavone 표준품 6종(Daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein) 각 1 mg을 각각 dimethylsulfoxide(DMSO) 1 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Malonylgenistin 표준품은 5 mg을 100% methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 만들었다. Stock solution 각각 100 μ l를 취하여 100% methanol 1 ml로 정용하여 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 동량으로 혼합하여 mixture를 만들고 단계적으로 희석하여 10, 5, 2, 1, 0.2, 0.1 ppm 용액을 만들었다. 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

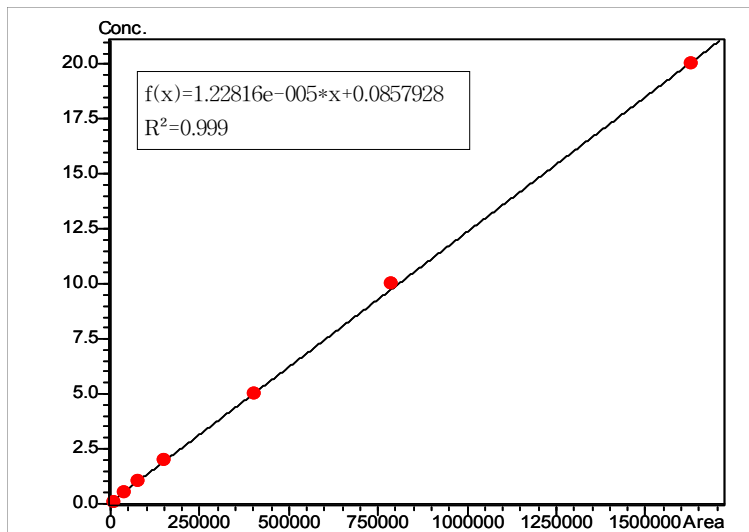
(라) 시료의 추출 및 정제

분쇄한 콩 0.1 g에 80% methanol 30 ml를 가하고 250 rpm에서 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μ m RC syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 20 μ l씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

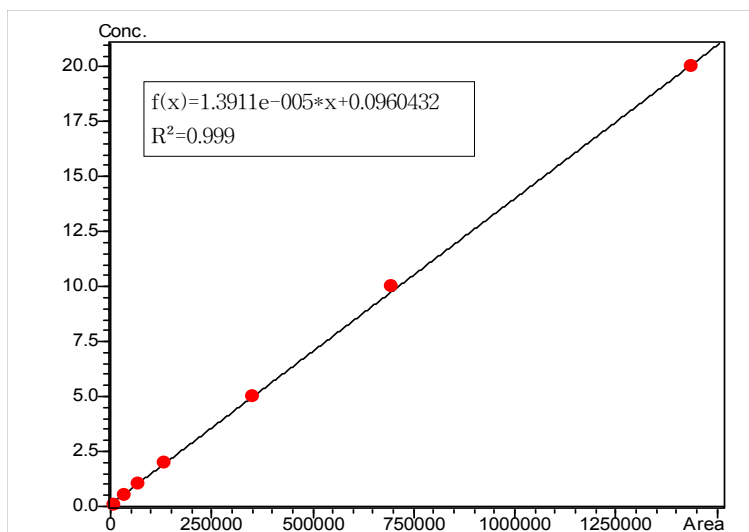
(4) 분석결과

(가) 표준용액 검량선

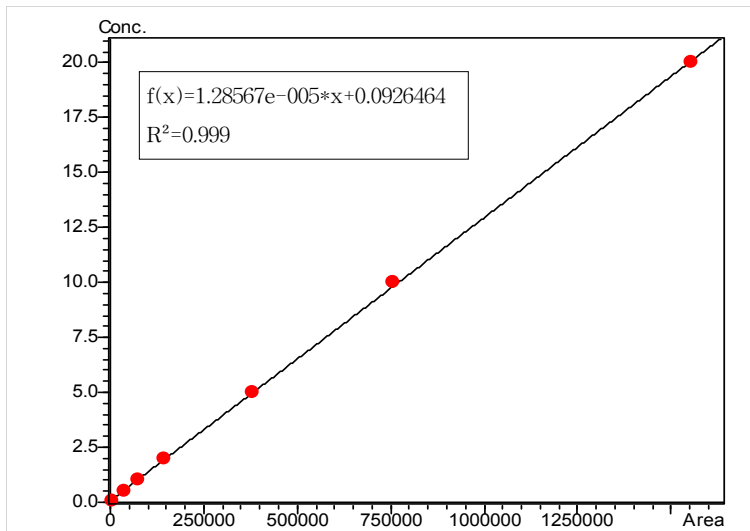
① Daidzin



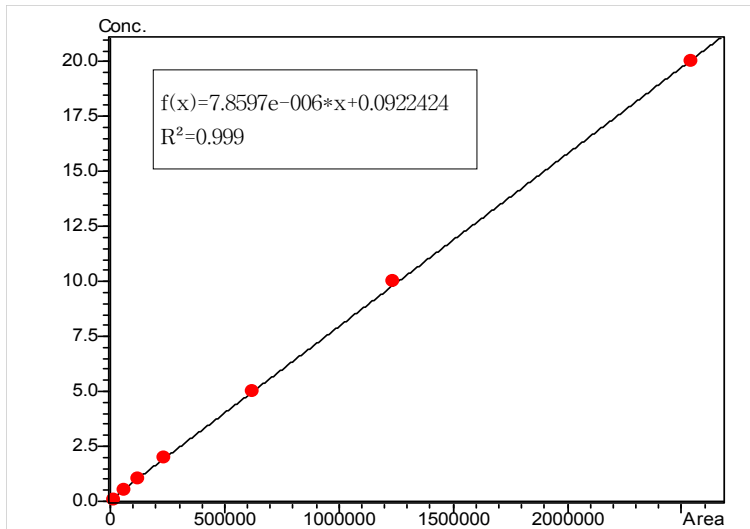
② Genistin



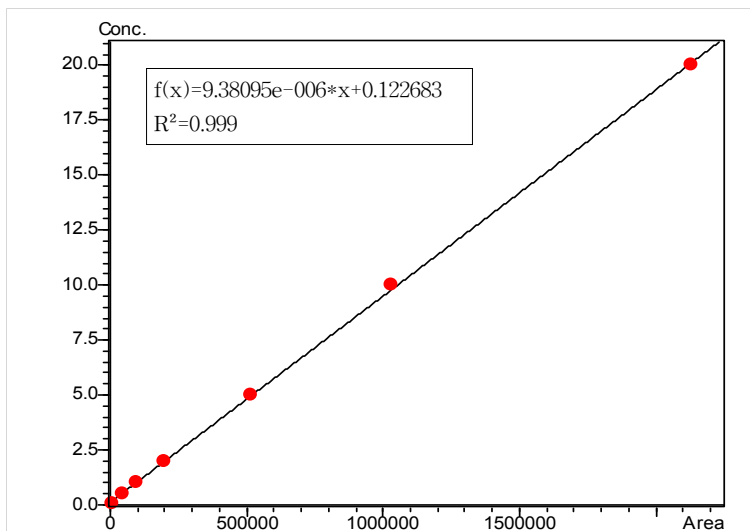
③ Glycitin



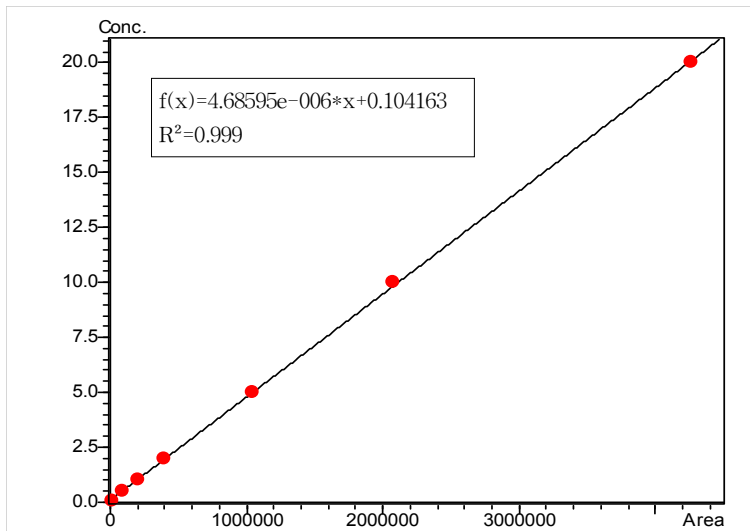
④ Daidzein



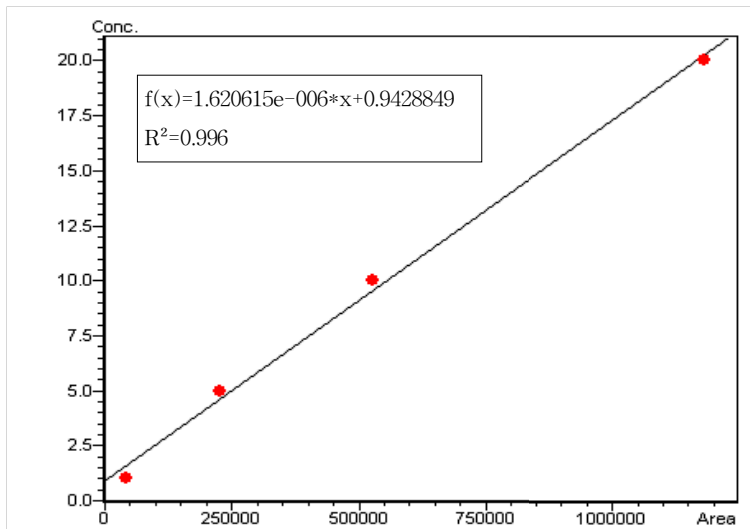
⑤ Genistein



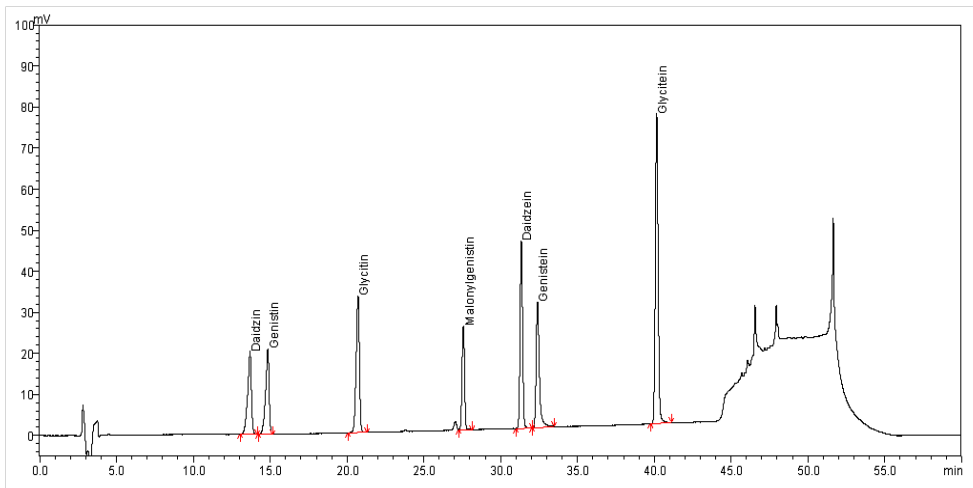
⑥ Glycitein



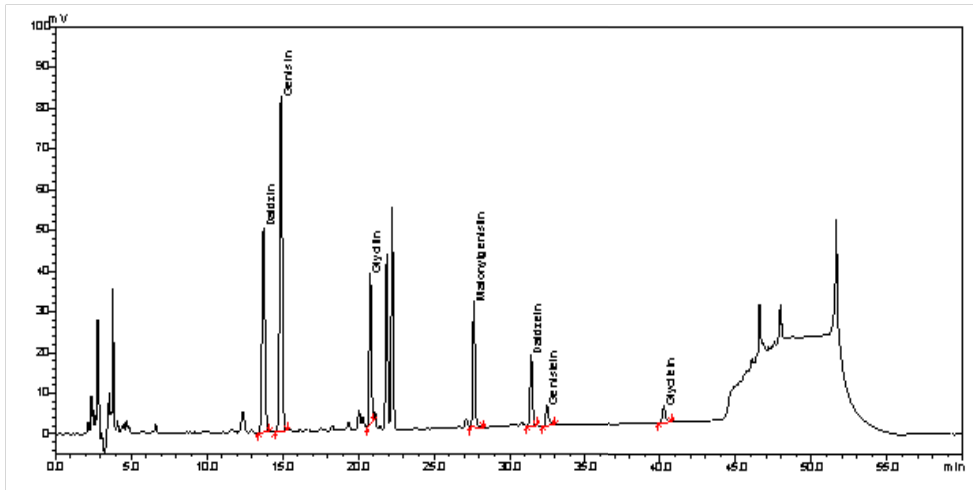
⑦ Malonylglycitin



(나) Isoflavone 표준용액(1ppm) 분석 크로마토그램



(다) 콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램



5. Isoflavone 성분 분석 (LC-MS)

(1) 분석기기 및 분석조건

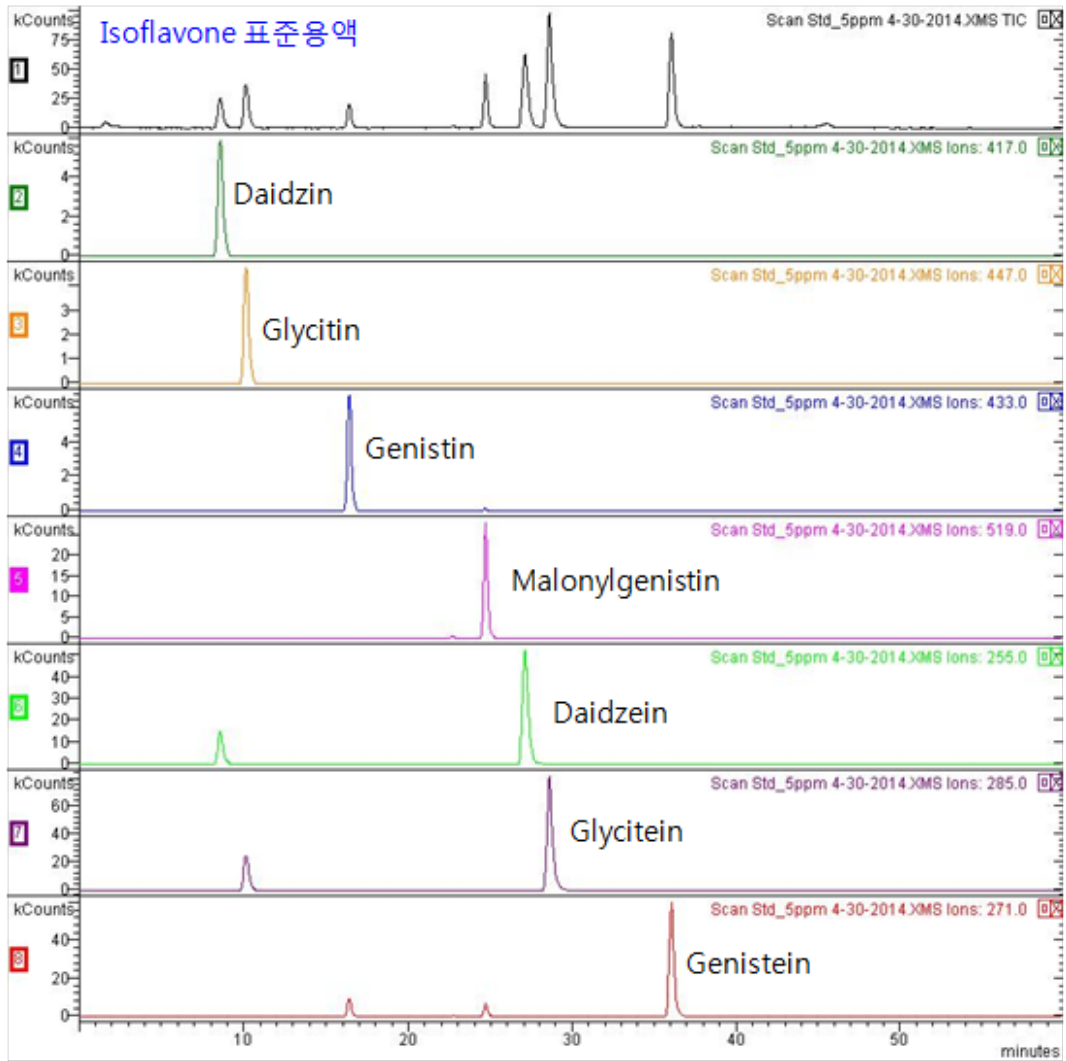
- Instrument: Agilent 1100 HPLC+Varian 500MS system
- Isonization and analyzer type: ESI(electro spray ionization) and Ion trap
- Column: YMC-Triart C18 (100 × 2.0 mm I.D. S-3 um, 12 nm)
- Mobile phase
 - Solvent A: Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B: Acetonitrile + 0.1% formic acid
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	85	15
2	85	15
20	75	25
40	60	40
45	100	100
50	85	15
60	85	15

- Flow rate: 0.2 mL/min
- Injection volume: 2 µL
- Analytical conditions
 - Scan range: 100-600 m/z
 - Drying temperature: 350 °C
 - Needle voltage: 3500 V
 - Capillary voltage: 80 V
 - Drying gas pressure (nitrogen) 30 psi
 - Nebulizer gas pressure (nitrogen) 40psi

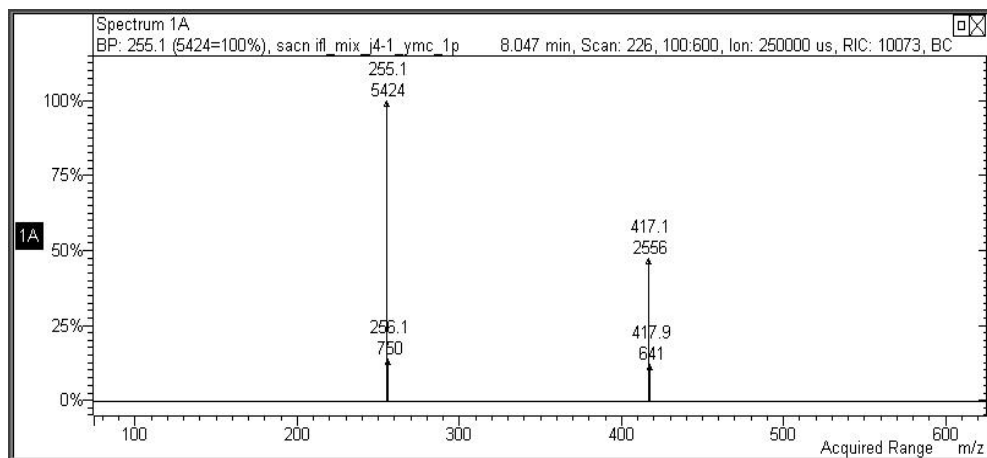
(2) 표준용액 분석 결과

(가) Isoflavone(7종) 표준용액 분석 결과 크로마토그램

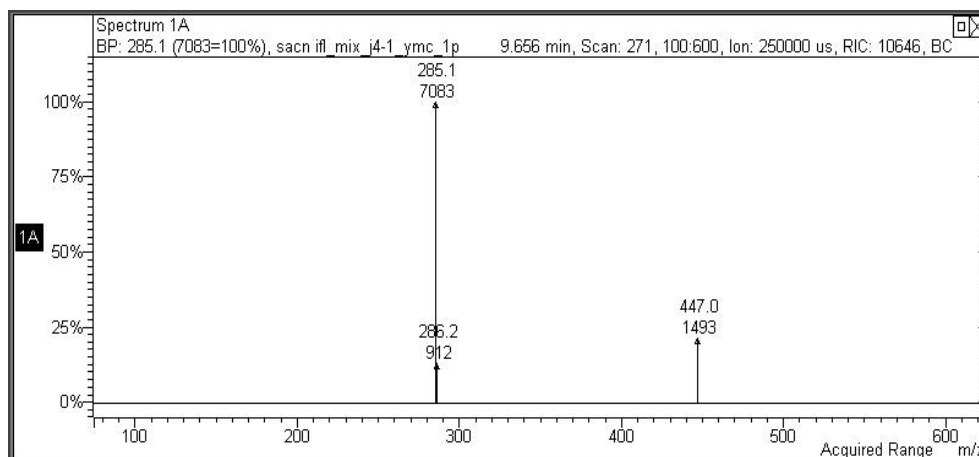


(나) Isoflavone(7종) 표준용액 MS spectrum 결과

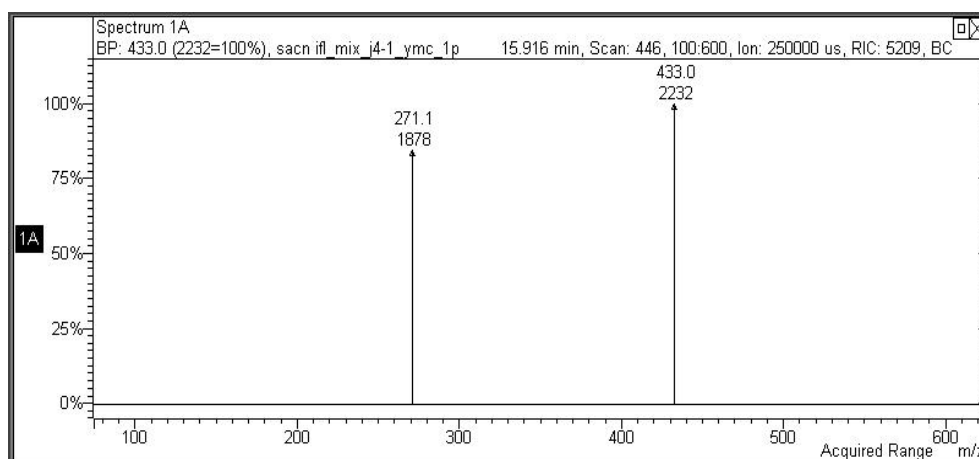
① Daidzin MS spectrum ($m/z = 417$)



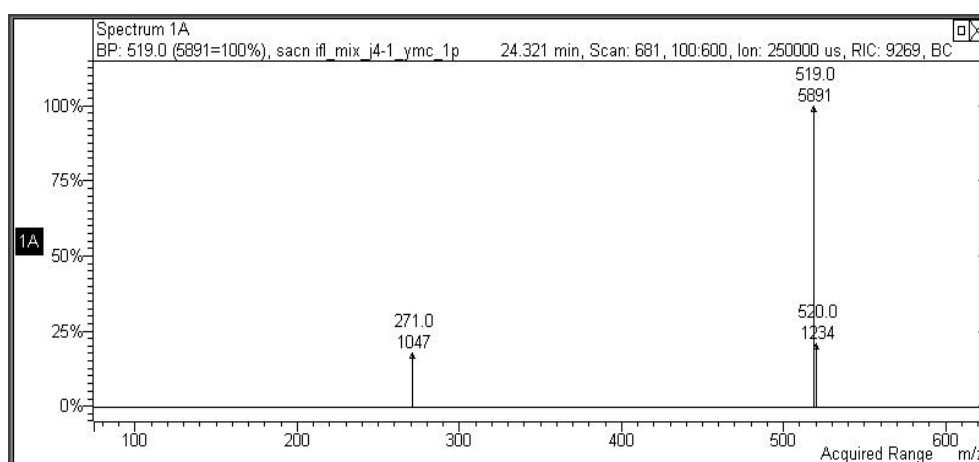
② Glycitin MS spectrum ($m/z = 447$)



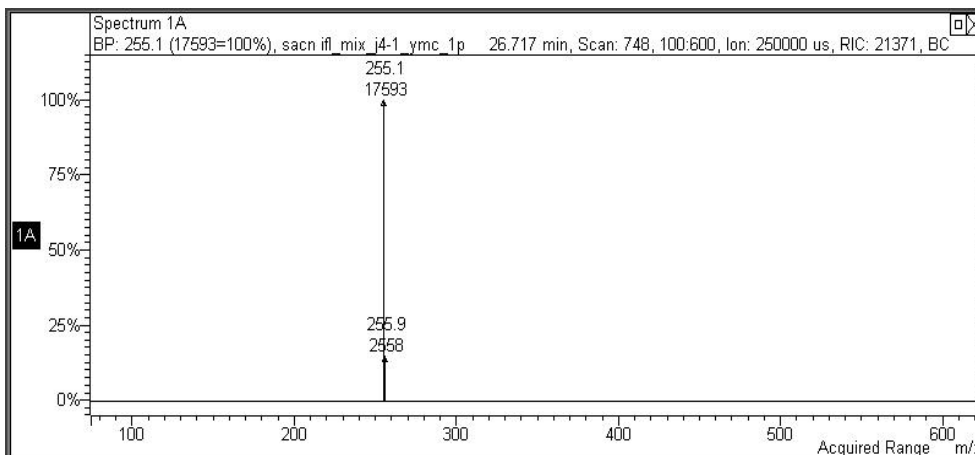
③ Genistin MS spectrum ($m/z = 433$)



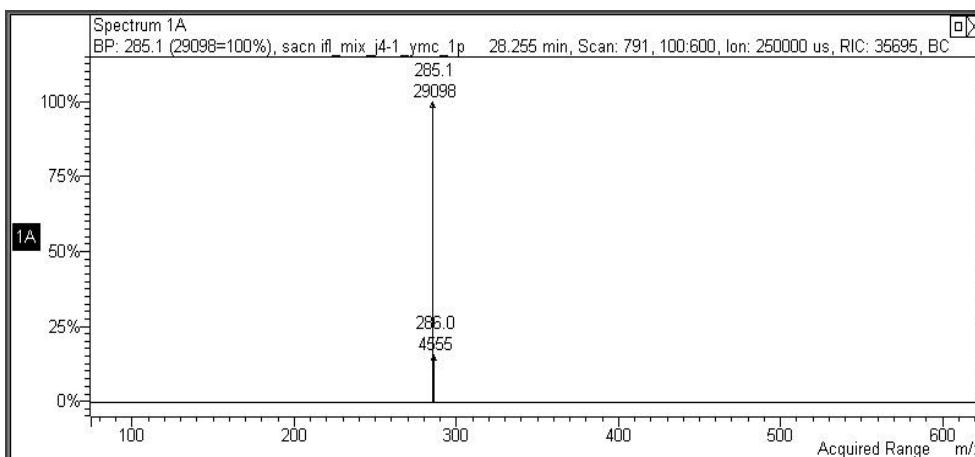
④ Malonylgenistin MS spectrum ($m/z = 519$)



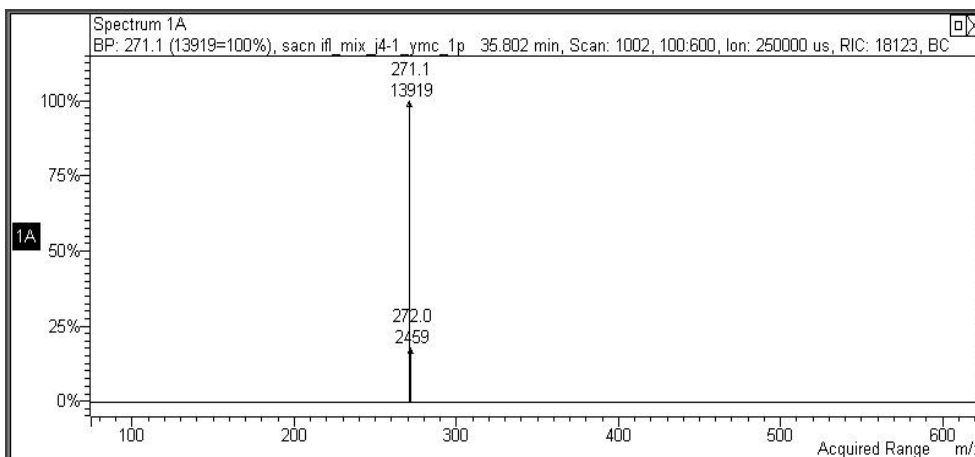
⑤ Daidzein MS spectrum ($m/z = 255$)



⑥ Glycitein MS spectrum ($m/z = 285$)

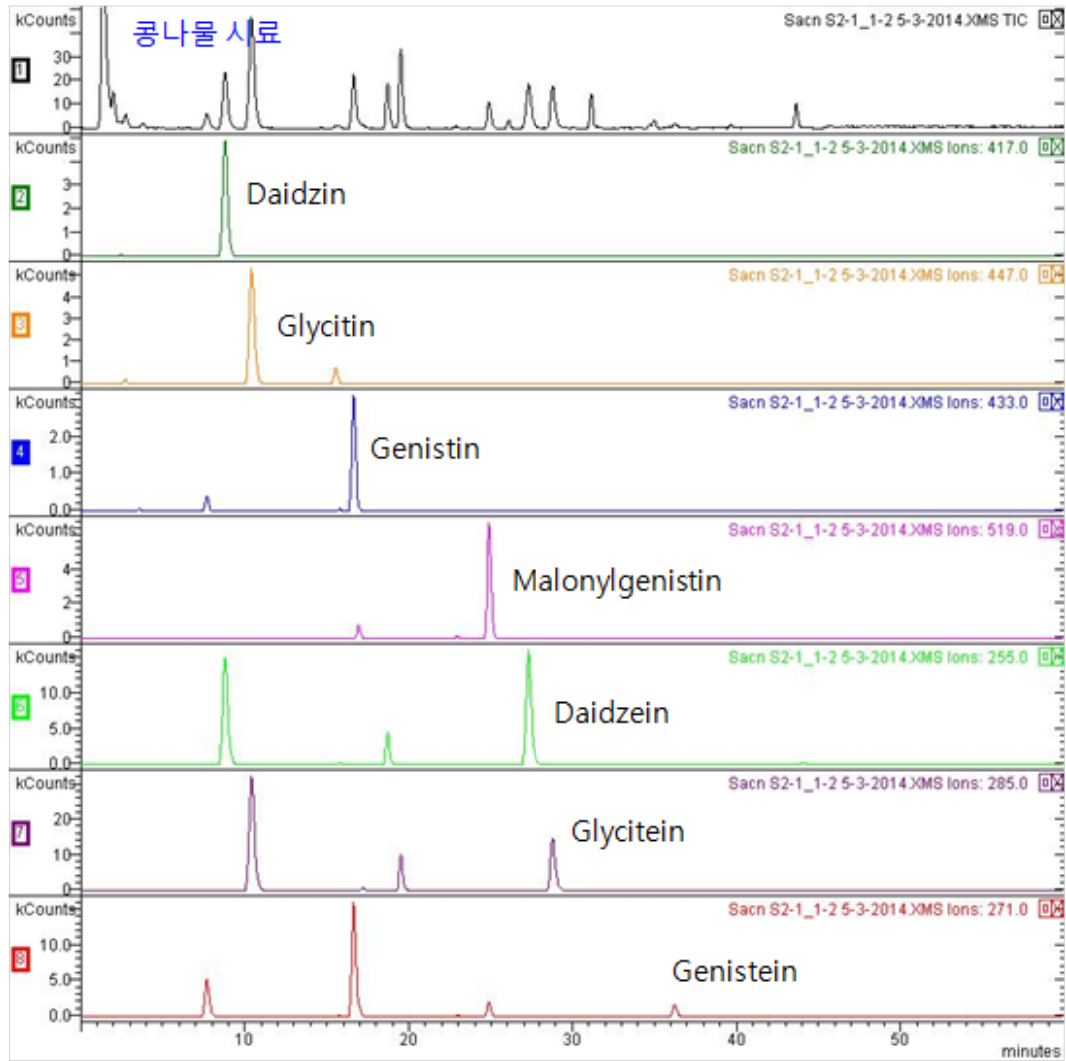


⑦ Genistein MS spectrum ($m/z = 271$)



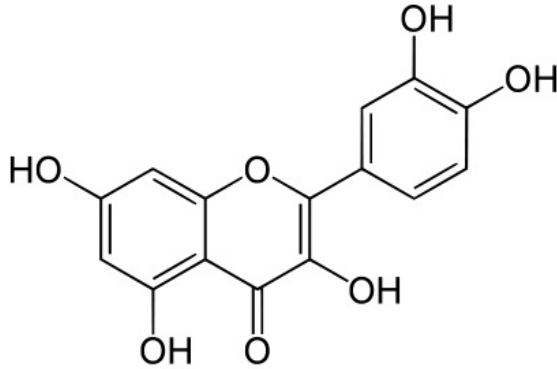
(2) 시료 분석 결과

(가) 콩나물 시료 분석 결과 크로마토그램



6. Quercetin 성분 분석

(1) 분석물질 : Quercetin



Quercetin (C₁₅H₁₀O₇)

(2) 시험작물 : 양파

(3) Quercetin 성분 분석법

(가) 시약 및 기구

- ① Analytical standard : Quercetin dehydrate, Sigma (USA)
- ② Methanol : HPLC grade, Burdic&Jackson (USA)
- ③ 50 ml TPP tube, 2 ml amber vial
- ④ Homogenizer : ULTRA TURRAX, T25 basic, PT 10/25
- ⑤ Shaker : VISON SCIENTIFIC co., LTD
- ⑥ Balance : HANSUNG (Korea)

(나) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Varian ProStar 230/410/330 LC (US)
- ② Detector : Varian ProStar 330 (Wavelength : 380nm)
- ③ Column : Luna C18 (250 X 4.60mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Methanol + 0.1% formic acid
 - Solvent B : DW + 0.1% formic acid
 - Gradient program

Time(min)	%A	%B
0	10	90
5	10	90
30	80	20
40	80	20
45	10	90
60	10	90

⑤ Flow rate : 0.8 ml/min

⑥ Injection volume : 10 μ l

(다) 검량선 작성

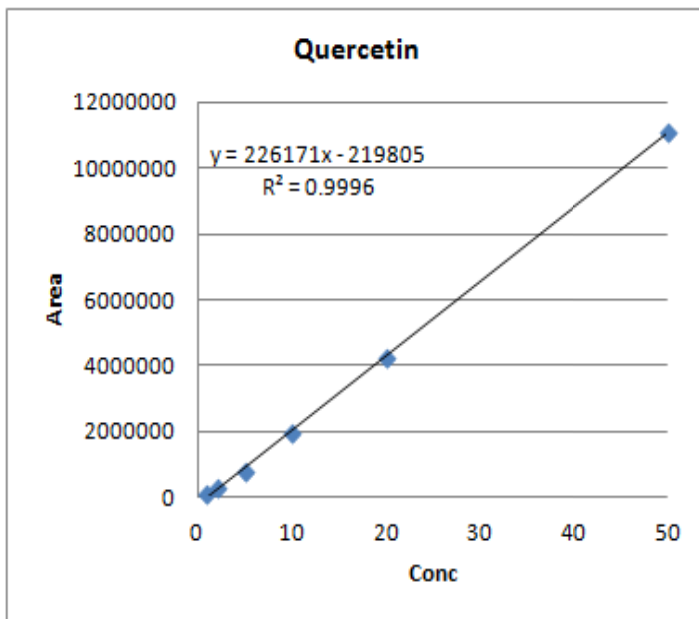
Quercetin dehydrate 10 mg을 90% methanol 10 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 용액 1 ml를 취하여 90% methanol 10 ml로 정용 100 ppm working solution을 제조하였다. 이 표준 용액을 단계적으로 희석하여 50, 20, 10, 5, 2, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 10 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

(라) 시료의 추출

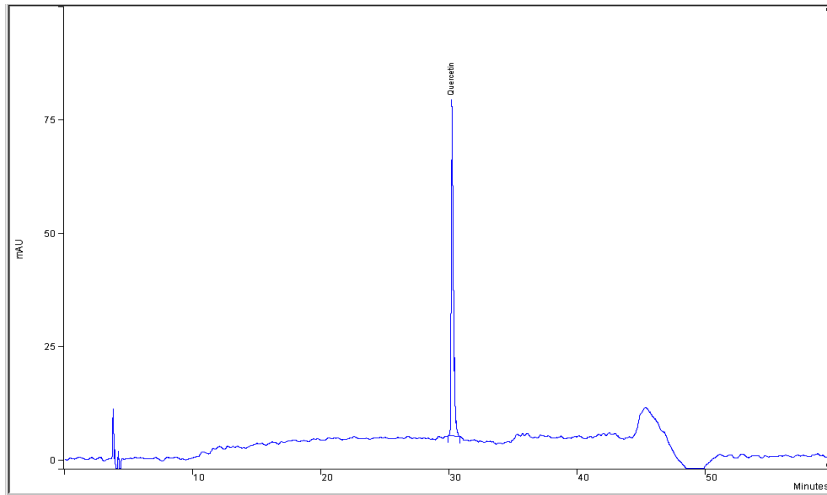
양과 시료 5 g에 90% methanol 20 ml을 넣고 high-speed homogenizer로 1분간 분쇄 하였다. 시료가 담긴 tube를 shaker에 넣고 250 rpm에서 2시간 동안 추출하였다. 시료를 2,800 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 0.2 μ m PVDF syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

(4) 분석결과

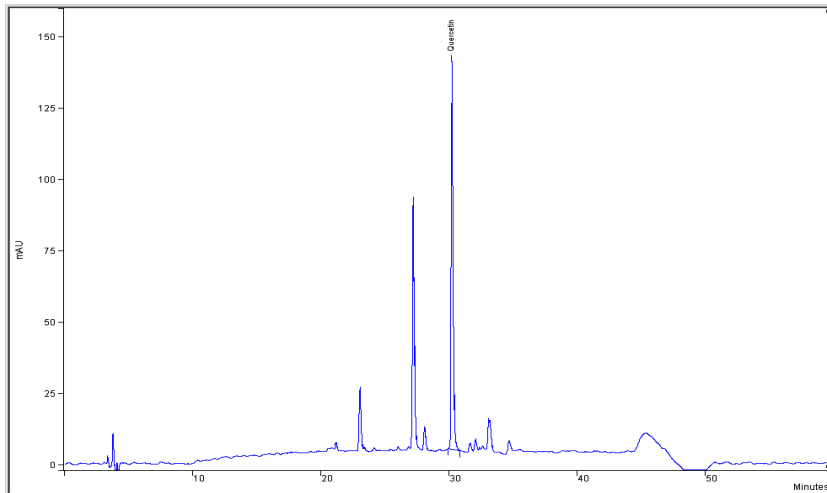
(가) 검량선



(나) Quercetin 표준용액 (20ppm) 분석 크로마토그램

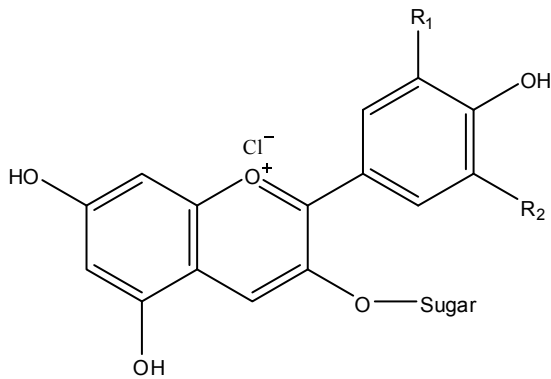


(다) 양과 시료 분석 크로마토그램



7. Anthocyanin 성분 분석

(1) 분석물질 : Anthocyanin



Anthocyanin	R1	R2
Cyanidin-3-glucoside (C3G)	-OH	-H
Delphinidin-3-glucoside (D3G)	-OH	-OH
Pelargonidin-3-glucoside(Pg3G)	-H	-H
Malvidin-3-glucoside (Mv3G)	-OCH3	-OCH3
Peonidin-3-glucoside (Pn3G)	-OCH3	-H
Petunidin-3-glucoside (Pt3G)	-OH	-OCH3
Cyanidin-3-galactoside (C3Gal)	-OH	-H

(2) 시험작물 : 베리류(블랙초크베리, 피플초크베리, 베리), 복숭아, 감귤 등

(3) Anthocyanin 성분 분석법

(가) 시약 및 기구

- ① Analytical standard : Polyphenols Laboratories AS (NORWAY)
Cyanidin-3-glucoside (C3G), Delphinidin-3-glucoside (D3G),
Pelargonidin-3-glucoside (Pg3G), Malvidin-3-glucoside (Mv3G),
Peonidin-3-glucoside (Pn3G), Petunidin-3-glucoside (Pt3G),
Cyanidin-3-galactoside (C3Gal)
- ② Acetonitrile : HPLC grade, Burdic & Jackson (USA)
- ③ Hydrochloride solution : Wako (Japan)
- ④ Formic acid : Sigma-aldrich (USA)
- ⑤ Shaker : VISON SCIENTIFIC co., LTD
- ⑥ Balance : AND HF-2000GD Balance (Korea)

(나) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Shimadzu 10Avp HPLC
- ② Detector : UV/VIS detector (Wavelength : 520 nm)
- ③ Column : Luna C18 (Phenomenex, 250 X 4.60mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : DW + 5%formic acid
 - Solvent B : Acetonitrile + 5%formic acid
 - Gradient program

Time(min)	%A	%B
0	90	10
10	80	20
16	30	70
20	30	70
23	90	10
35	90	10

⑤ Flow rate : 0.7 ml/min

⑥ Injection volume : 20 μ l

(다) 검량선 작성

Anthocyanin 7종 표준용액 각 5 mg을 1%HCl- 20%methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 표준용액을 단계적으로 희석하여 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 ppm 용액을 조제하였다. 이 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

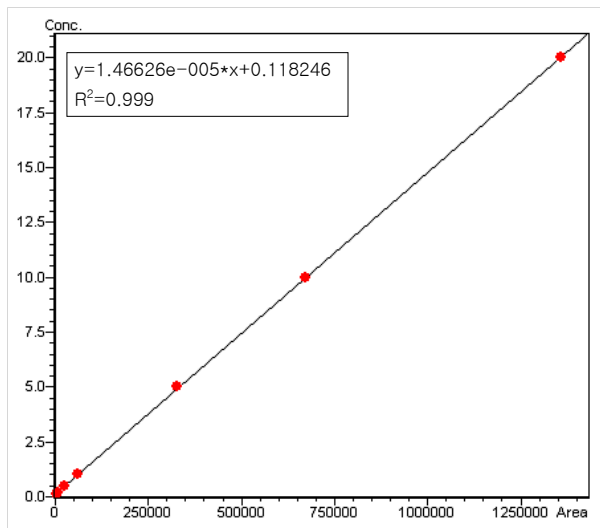
(라) 시료의 추출

동결건조된 시료 0.1g에 1%HCl- 20%methanol 30 ml을 넣고 250 rpm에서 12시간 동안 추출하였다. 시료를 원심분리기로 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 한 후 상층액을 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다. 위 과정은 3번 반복하여 추출하였다.

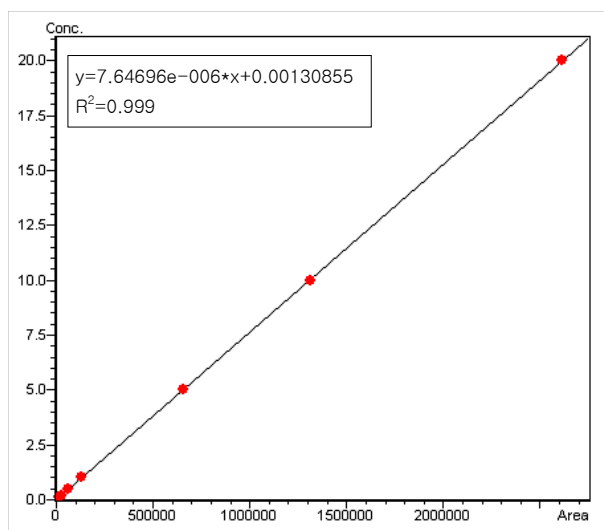
(4) 분석결과

(가) 검량선

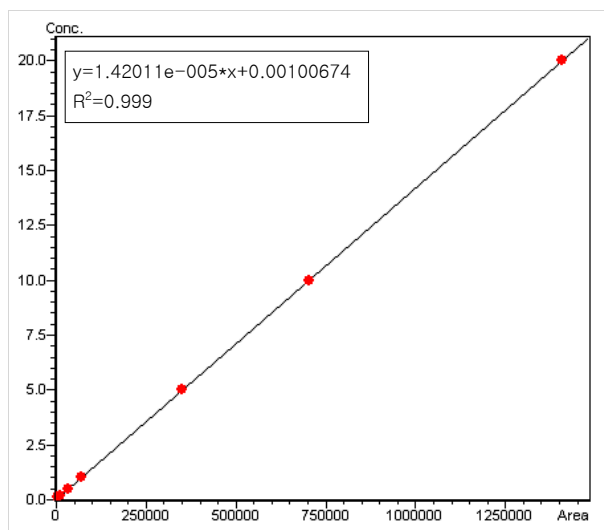
① Delphinidin-3-glucosid (D3G)



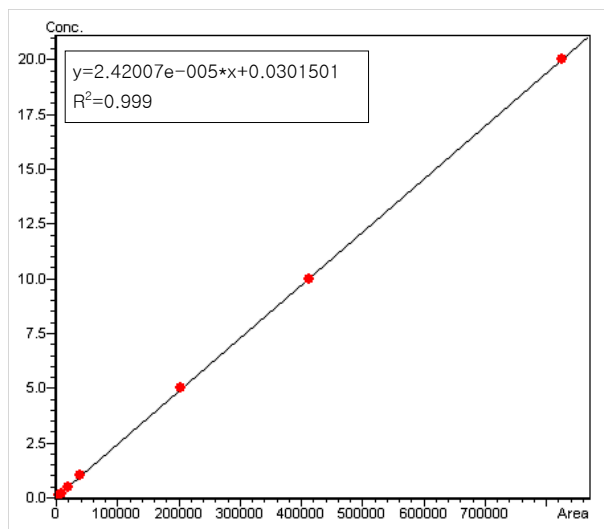
② Cyanidin-3-galactoside (C3Gal)



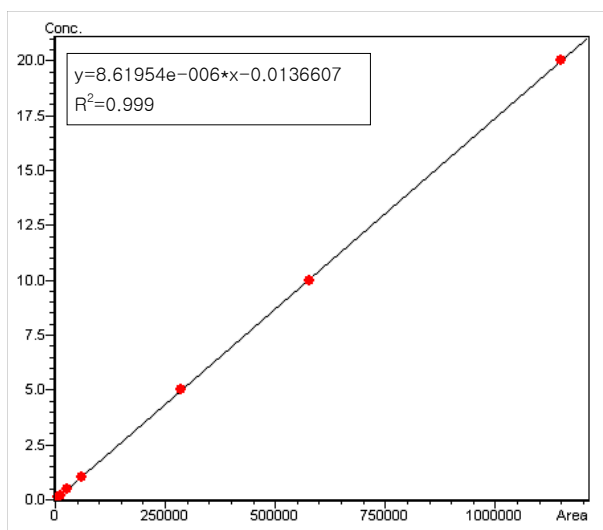
③ Cyanidin-3-glucoside (C3G)



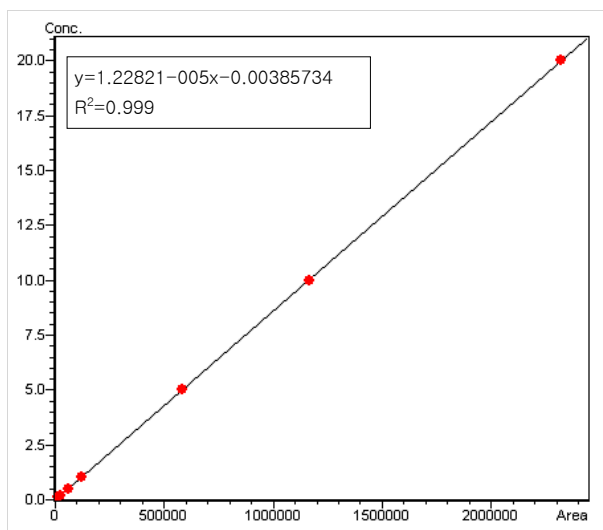
④ Petunidin-3-glucoside (Pt3G)



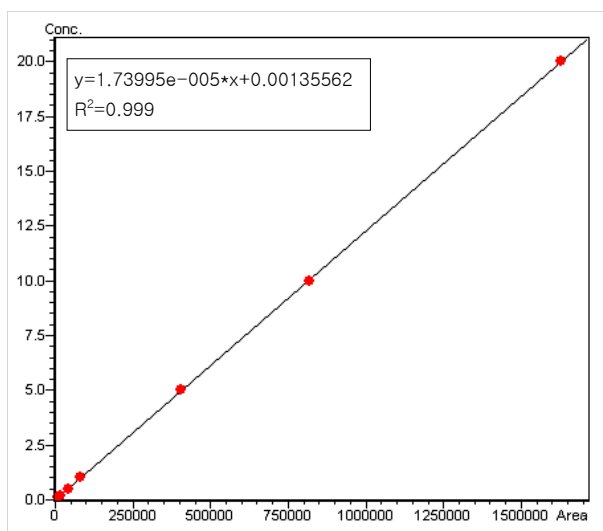
⑤ Pelagonidin-3-glucoside(Pg3G)



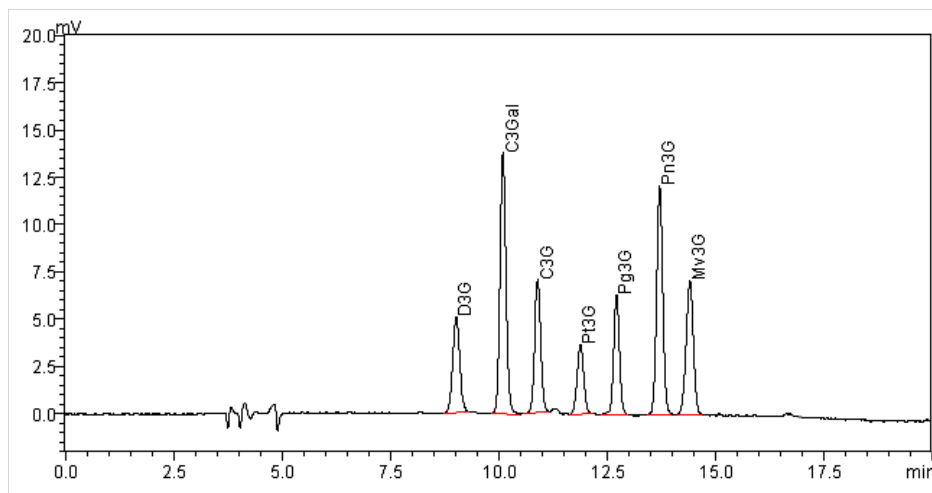
⑥ Peonidin-3-glucoside(Pn3G)



⑦ Malvidin-3-glucoside(Mv3G)

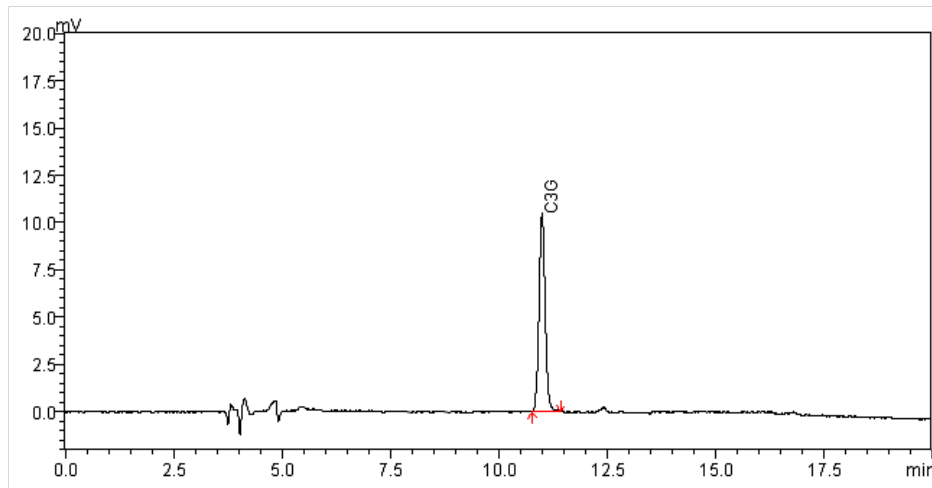


(나) Anthocyanin 표준용액(1ppm) 분석 크로마토그램

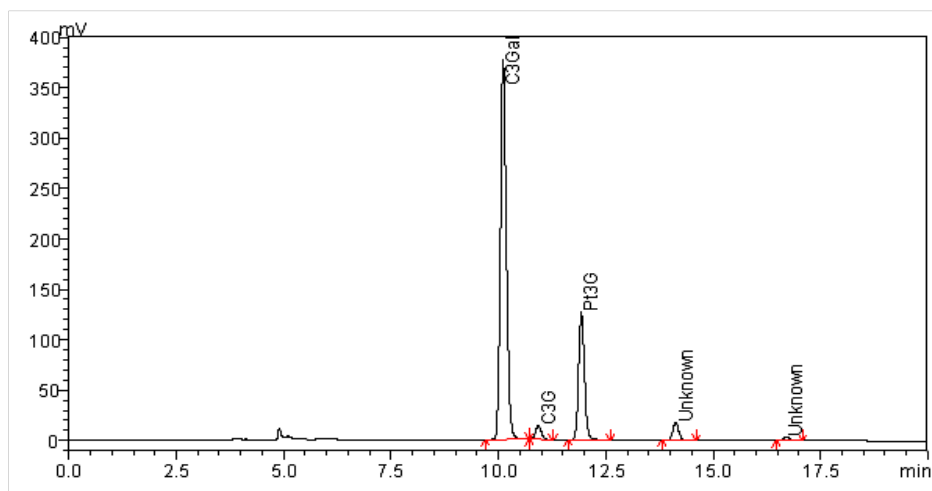


(다) 시료 분석결과 크로마토그램

① 복숭아

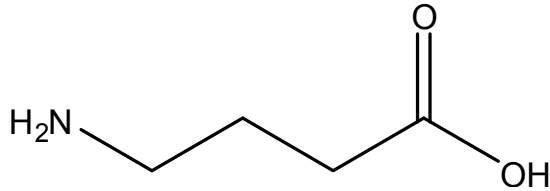


② 블랙초크베리



8. GABA 성분 분석

(1) 분석물질 : γ -Aminobutyric acid (GABA)



4-aminobutanoic acid (C₄H₉NO₂)

(2) 시험작물 : 쌀류(현미, 발아현미, 거대배아미 등), 현미효소제품, 구지빵 등

(3) GABA 성분 분석법

(가) 시약 및 기구

① Analytical standard

- γ -Aminobutyric acid (>99%) : Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)

② Chemicals

- 0.1N HCl : HPLC grade, WAKO (Japan)
- Acetonitrile, acetone : Burdic & Jackson (USA)

③ Balance : AND HM-200 Balance (Japan)

④ Centrifuge : Hanil MICRO 17-TR (USA)

(나) 분석기기 및 분석조건

① Instrument : Shimadzu GC-2010 (Japan)

② Detector : FID (Flame Ionization detector), 320°C

③ Column : ZB-5 (30m x 0.25mm, 0.25 μ m)

④ Injection : Split 1:15, 300°C, 2.0 μ L

⑤ Makeup Gas : N₂/Air

- Makeup flow : 30.0mL/min

- H₂ flow : 40.0mL/min

- Air flow : 400.0mL/min

⑥ Oven Program : 2°C/min from 80° (Hold 2min) to 200°C (Hold 2min)

10°C/min from 200° (Hold 2min) to 320°C (Hold 10min)

(다) 검량선 작성

EZ:Faast kit에는 0.2 mM norvaline이 internal standard(IS)로 포함되어있다.

GABA 표준용액 5 mg을 DW 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 표준용액을 단계적으로 희석하여 100, 50, 20, 10, 5 ppm 용액을 조제하였다. GABA 표준용액을 EZ:Faast kit를 이용하여 유도체화 후 각각 2 μ L씩 주입하여 chromatogram 상에 나타난 IS와 GABA 표준용액의 peak area ratio를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

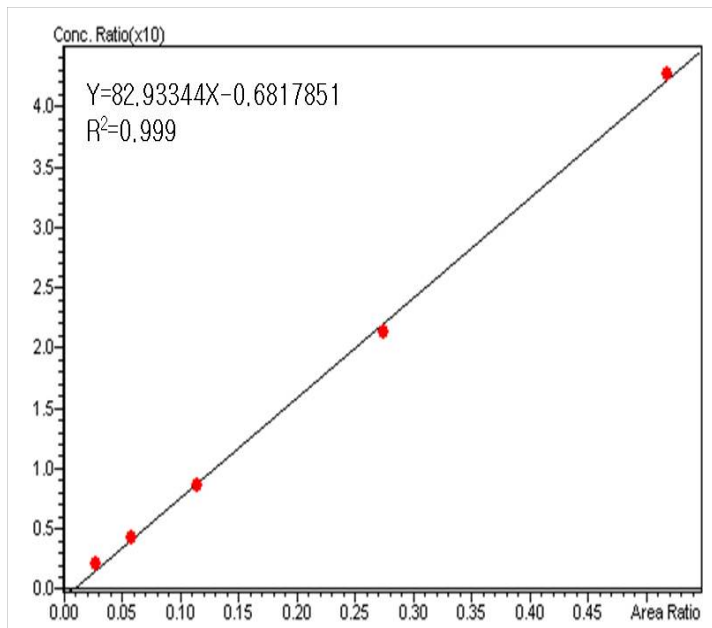
(라) 시료의 추출 및 유도체화 과정

※ 쌀류 추출과정은 EZ:Faast kit에서 제공된 추출과정을 일부 변형하여 사용하였다.

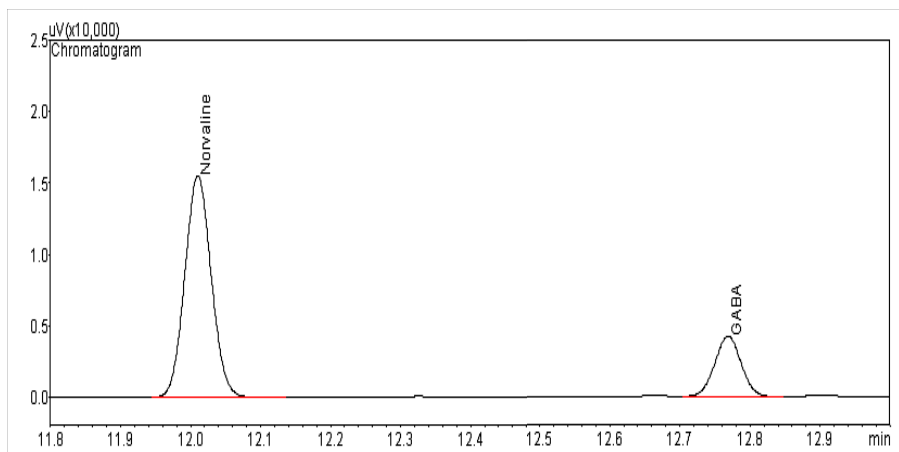
2 mL tube에 시료 50 mg을 넣고 25% acetonitrile/0.01N HCl을 1 mL 분주하였다. Tube를 vortex에 고정하여 1분 동안 혼합하고 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 상등액을 0.2 µm syringe filter를 이용하여 여과한 후 EZ:Faast kit를 사용하여 유도체화 하였다. 유도체화를 통해 얻어진 유기용매층을 각각 2 µL 주입하여 GC-FID로 분석하였다. 각 시료는 3반복 추출하였다.

(4) 분석결과

(가) GABA 검량선



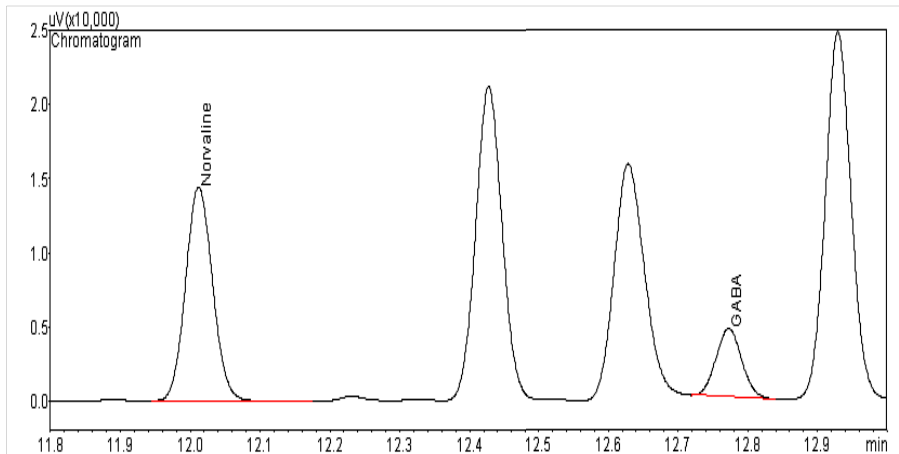
(나) GABA 표준용액(50ppm) 분석 크로마토그램



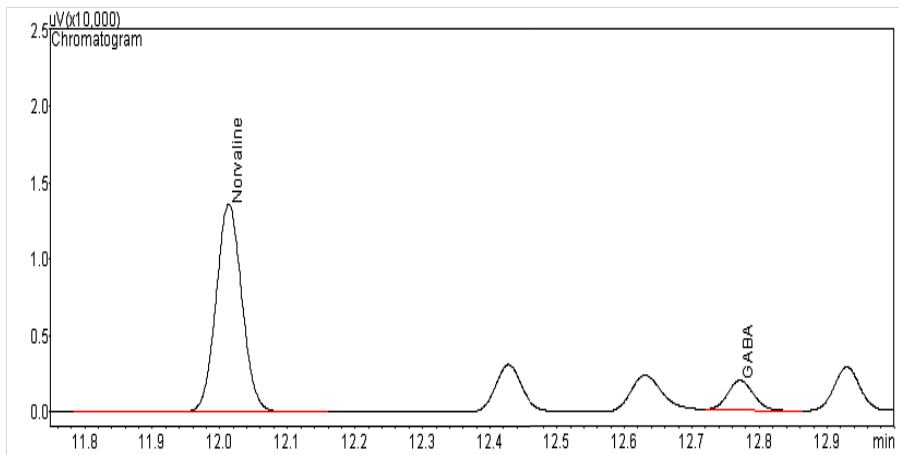
* Internal Standard; Norvaline

(다) 시료 분석 크로마토그램

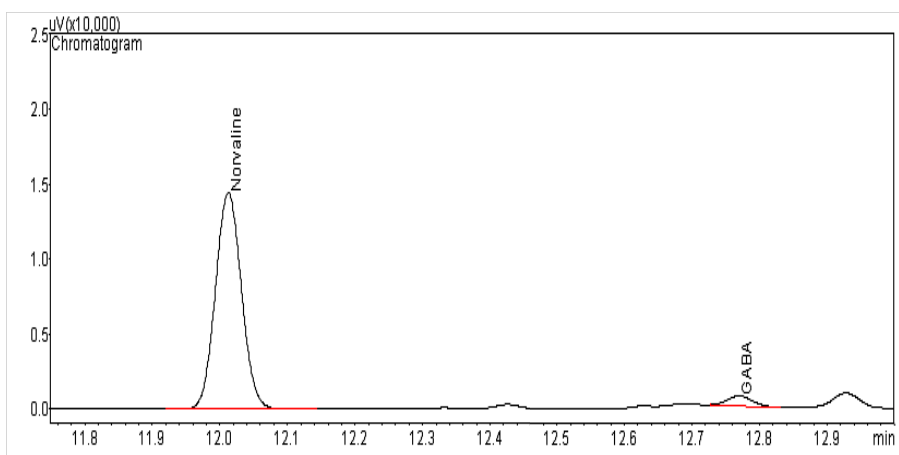
① 구지뽕+거대배아현미



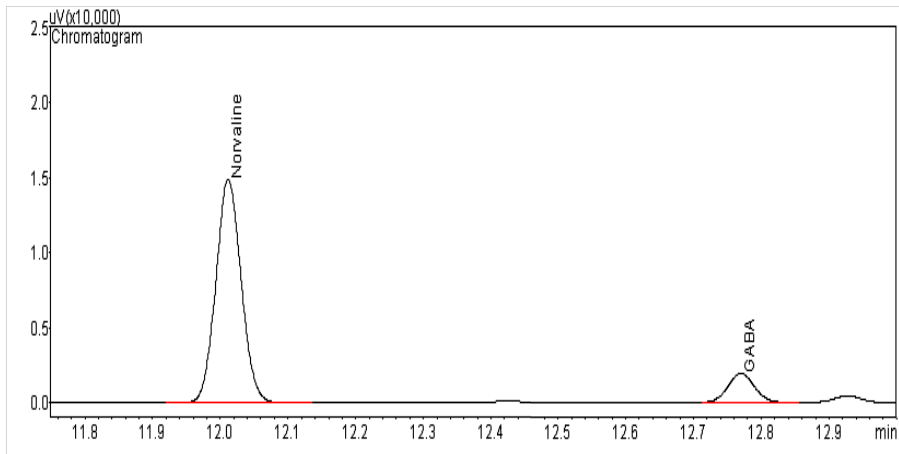
② 눈이큰유기현미효소식



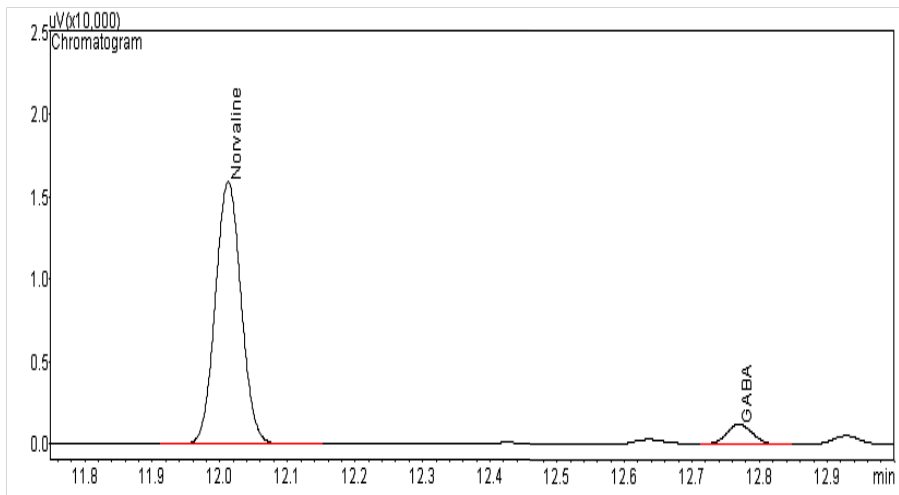
③ 발아현미



④ 효소현미

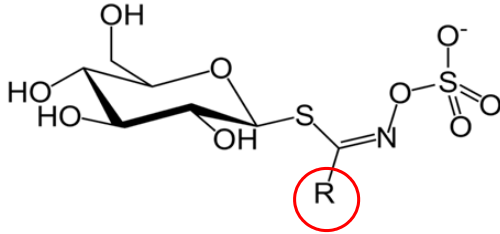


⑤ 일반현미 (General rice)



9. Glucosinolates 성분 분석

(1) 분석물질 : Sinigrin 외 10종



Aliphatic group	R
Progoitrin	CH ₂ =CH-CH(OH)-CH ₂ -
Glucoaphanin	CH ₃ -SO-(CH ₂) ₄ -
Gluconapoleiferin	CH ₂ =CH-CH-CH(OH)-CH ₂ -
Glucoalysin	CH ₃ -SO-(CH ₂) ₅ -
Gluconapin	CH ₂ =CH-CH ₂ -CH ₂ -
Gluco Brassicanapin	CH ₂ =CH-(CH ₂) ₃ -
Glucoerucin	CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -(CH ₂) ₂
Glucoberteroin	5-methylthiopentyl
Sinigrin	CH ₂ =CH-CH ₂ -
Indole group	
4-hydroxygluco Brassin	4-Hydroxyindole-3-ylmethyl
Gluco Brassicin	Indole-3-ylmethyl
4-methoxygluco Brassicin	4-methoxyindole-3-ylmethyl
Neoglucobrassicin	1-methoxyindol-3-ylmethyl-
Aromatic group	
Gluconasturtiin	C ₆ H ₅ -CH ₂ CH ₂ -
Gluco tropaeolin	C ₆ H ₅ -CH ₂ -

(2) 시험작물 : 배추, 브로콜리, 무, 양배추 등 십자화과 식물

(3) 분석방법

(가) 분석기기 및 분석조건

① Instrument : Shimadzu LCMS-8030

(equiped with LC-30AD pump, SIL-30AC autosampler, CTO-30A column oven, SPD-20A UV-Vis detector and MS 8030 mass spectrometer)

② Isonization and analyzer type : ESI(electro spray ionization) and Ion trap

③ Column : Kinetex C18 column (100 X 2.1 mm, 2.6 micron), 40 °C

④ Mobile phase

- Solvent A : Water + 0.1% formic acid

- Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid
- Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	99	1
1	99	1
3	95	5
13	20	80
20	20	80
22	99	1
30	99	1

- ④ Flow rate : 0.2 ml/min
- (6) Injection volume : 10 μ l
- (7) MS Analytical conditions
 - DL temperature : 250 $^{\circ}$ C
 - Heat block temperature : 400 $^{\circ}$ C
 - Drying gas flow : 15.0 L/min
 - Nebulizing gas flow : 3.0 L/min
 - Collision Energy : -10 V

(나) 정량용 SIM 이온

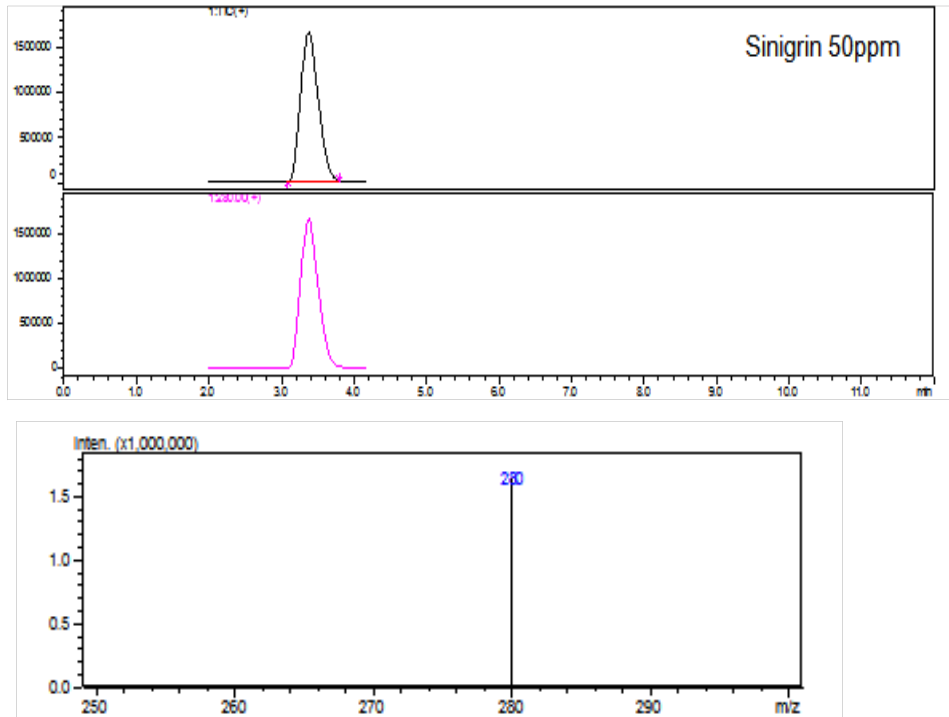
NO.	Glucosinolates	분자량(M)	Desulfo	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	progoitrin	388	309	310	308
2	glucoraphanin	436	357	358	356
3	sinigrin	358	279	280	278
4	glucoalyssin	450	371	372	370
5	gluconapoleiferin	402	323	324	322
6	gluconapin	372	293	294	292
7	4-hydroxyglucobrassicin	463	384	385	383
8	glucobrassicinapin	386	307	308	306
9	glucoerucin	418	339	340	338
10	glucobrassicin	447	368	369	367
11	4-methylglucobrassicin	477	398	399	397
12	glucoberterion	434	355	356	354
13	gluconastutriin	422	343	344	342
14	neoglucobrassicin	477	398	399	397
15	epiprogoitrin	388	309	310	308
16	glucotropaeolin	408	329	330	328
17	glucoiberin	422	343	344	342
18	glucocheirolin	438	359	360	358
19	glucobrabin	438	359	360	358
20	glucolesquerellin	448	369	370	368
21	glucohesperin	464	385	386	384
22	glucosinalbin	424	345	346	344
23	glucoepigoitrin	129	50	51	49

(다) 시료 추출

동결 건조된 시료 100 mg에 boiling 70% methanol 1.5 ml을 가하고 69°C water bath에서 5분간 처리 하였다. 추출물을 13,000g에서 10분간 원심분리 후 상층액은 1.5 ml tube에 옮겨두었다. 위 과정을 2회 반복 하여 상층액(총 4.5 ml)을 모두 혼합하였다. Crude상태의 추출물을 미리 준비한 DEAE anion exchange column에 흘려주었다. 이때, 1 mM sinigrin은 200 μ l만 분주하였다. DW로 1 ml씩 4회 분주하여 세척 후 sulfatase solution 50 μ l를 처리하였다. Column의 위, 아래 부분을 잘 막아준 다음 overnight 하였다(16시간 처리). Overnight 후 sample 당 DW 2.4 ml을 분주하여 desulfoglucosinolates 추출물을 얻었다. 추출물은 0.2 μ m syringe filter로 여과 하여 HPLC로 분석하였다.

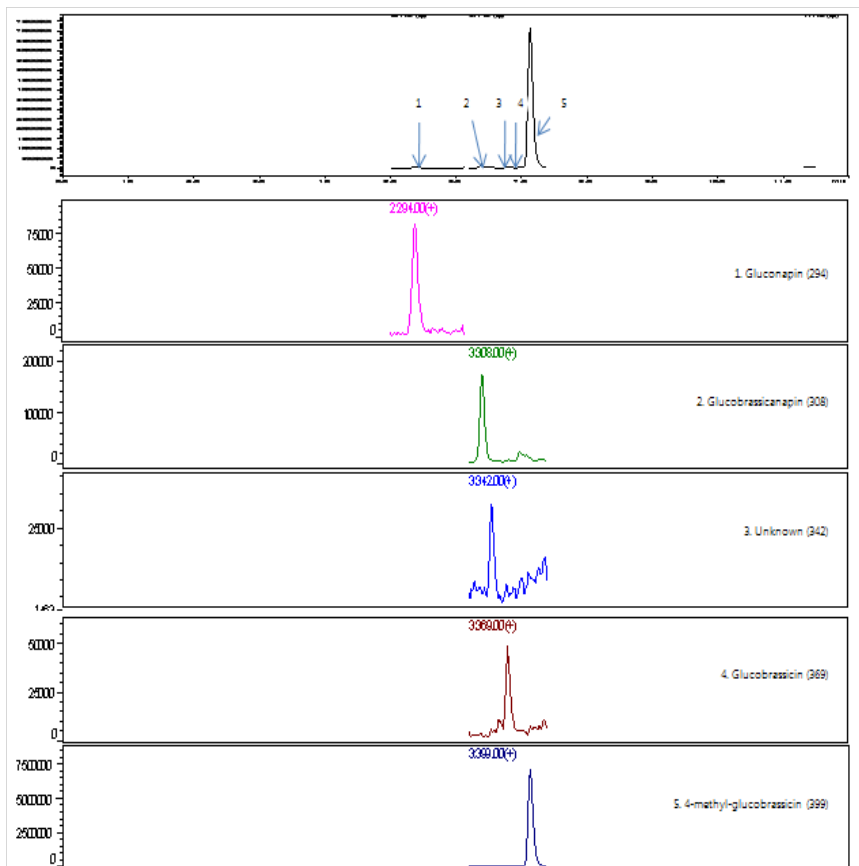
(4) 분석결과

(가) Sinigrin 표준용액 분석 결과 크로마토그램 및 MS spectrum

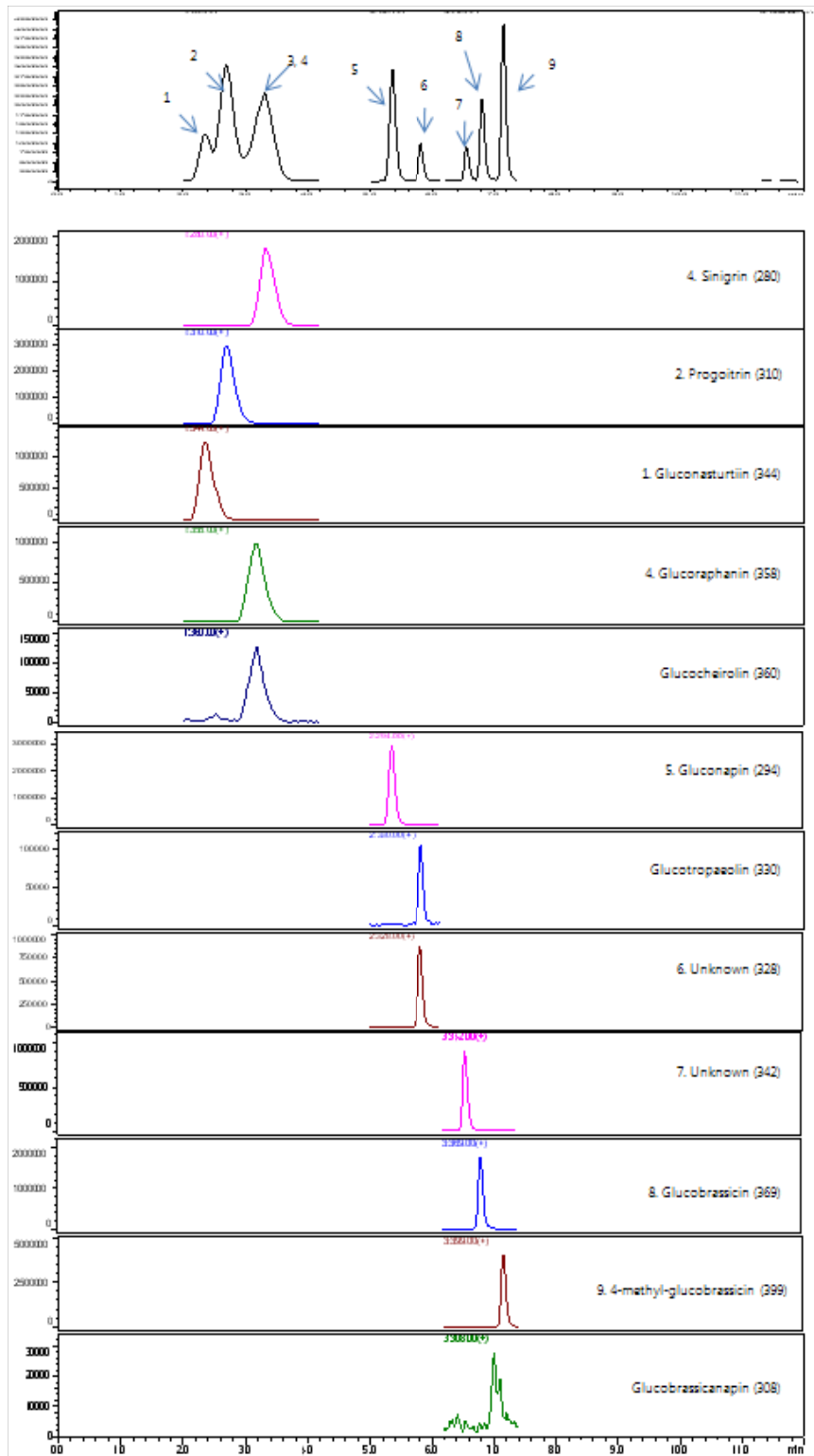


(나) 시료 분석 결과 크로마토그램

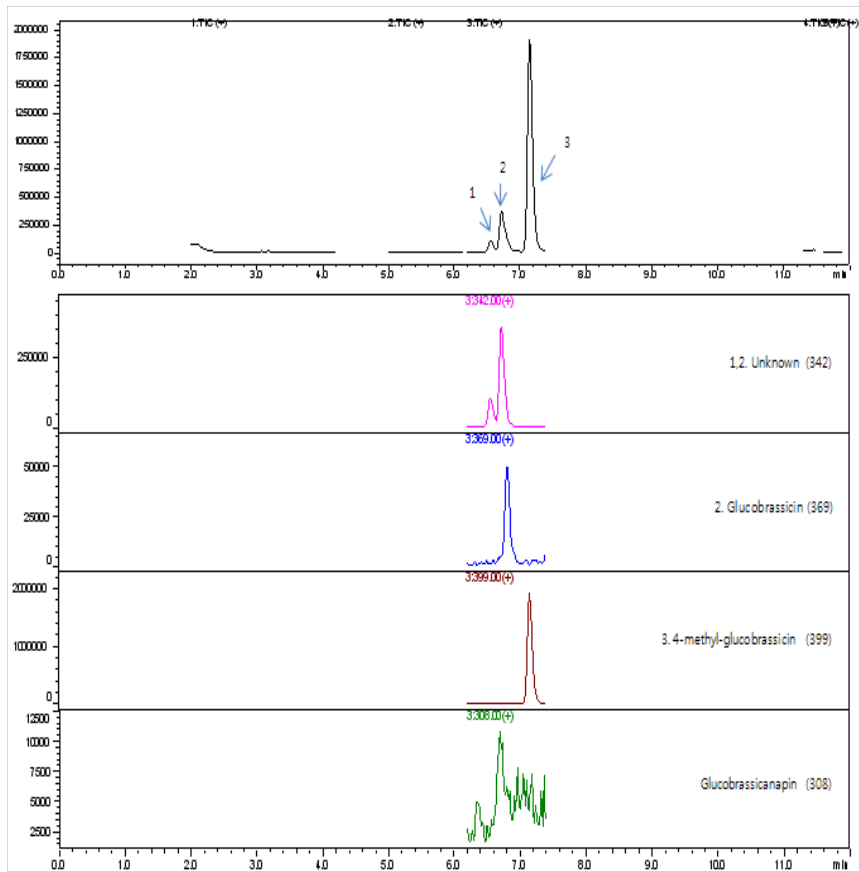
① 배추



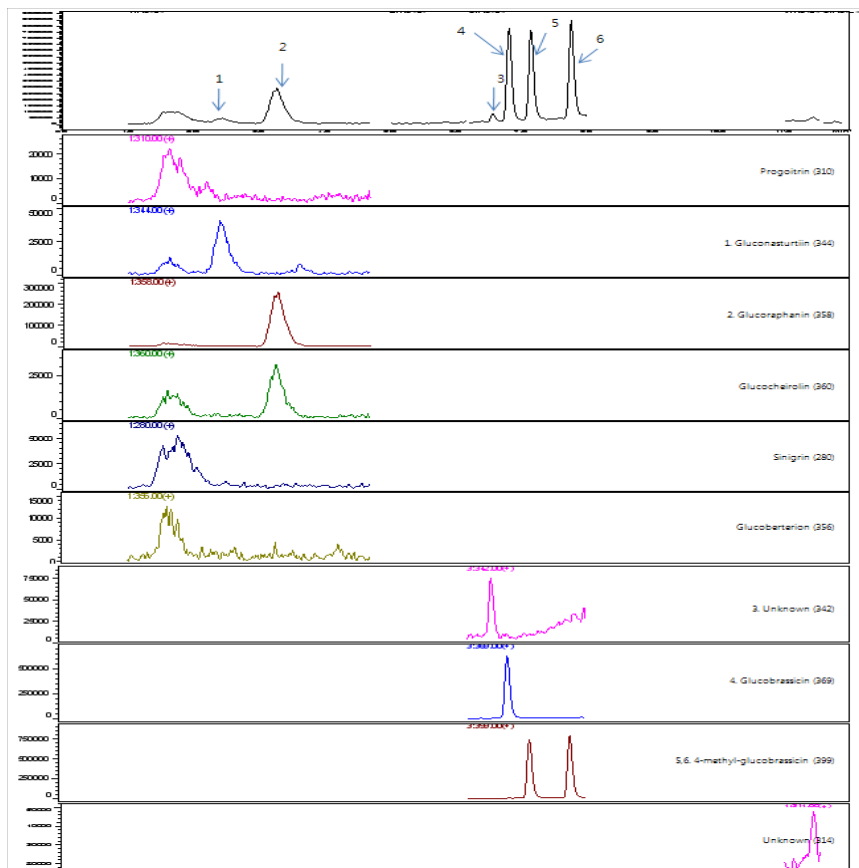
② 양배추



③ 무

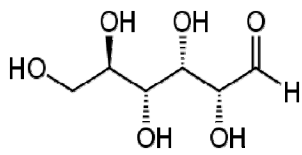


④ 브로콜리

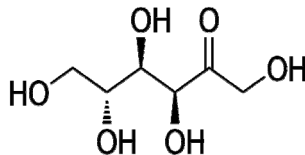


10. 당류(sugars) 성분 분석

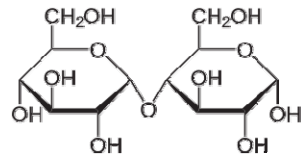
(1) 분석물질 : 당 5종 (Fructose, glucose, sucrose, maltose, raffinose)



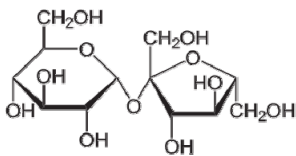
Glucose



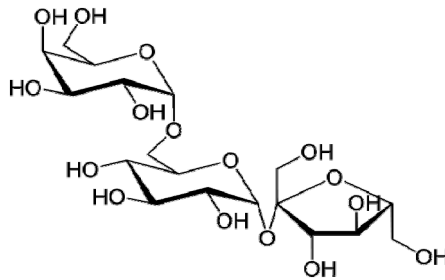
Fructose



Maltose



Sucrose



Raffinose

(2) 시험작물 : 수박, 포도, 참외, 쌀, 고추 등

(3) 분석방법

(가) 분석기기 및 분석방법

- ① Instrument : HP1100 series
- ② Detector : Alltech ELSD 2000
- ③ Column : Asahipak NH2P-40E Shodex (250 x 4.6 mm ID, 5 μ m)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile
 - Solvent B : Water
 - Gradient elution

Time	% DW	% ACN
0	5	95
2	5	95
7	35	65
20	35	65
23	5	95
28	5	95

⑤ Flow rate : 1.0 ml/min

⑥ Injection volume : 20 μ l

(나) 검량선 작성

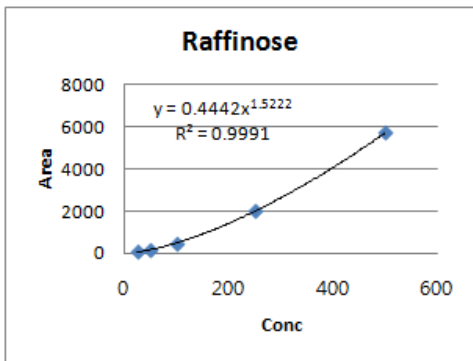
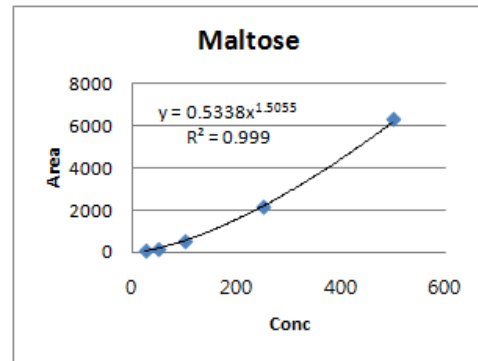
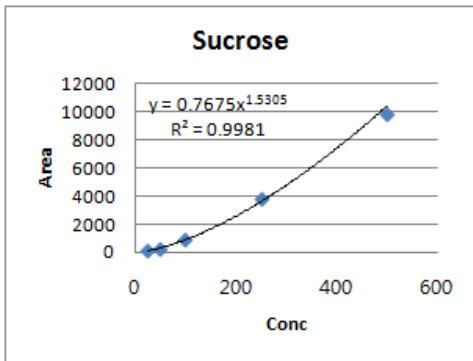
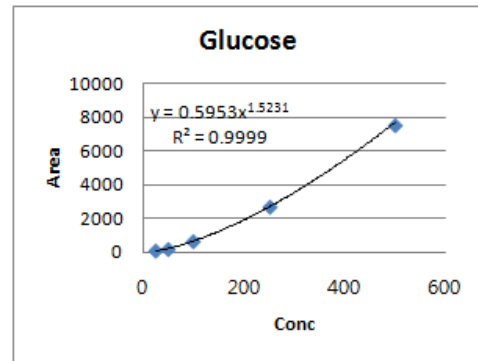
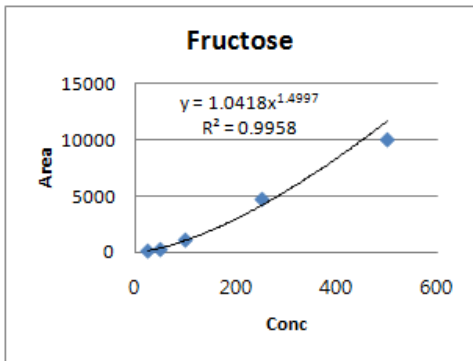
Fructose, glucose, sucrose, maltose 및 raffinose 표준품을 각각 25 mg 칭량하여 DW 25 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution(mixture)을 조제하였다. 이 표준 혼합 용액을 단계적으로 희석하여 500, 250, 100, 50, 25 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

(다) 시료 추출 방법

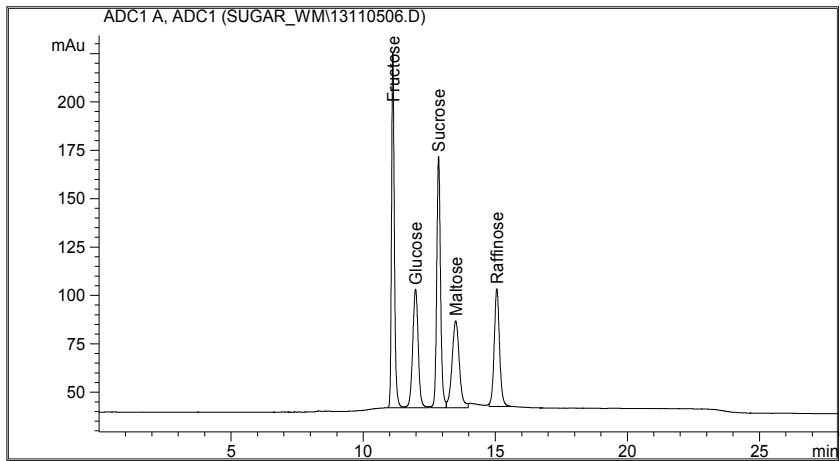
시료 1 g에 20 ml DW를 가하고 80 $^{\circ}$ C water bath에서 30분 동안 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 후 0.2 μ m PVDF syringe filter에 여과하였다. 각 시료는 3반복 추출하여 HPLC-ELSD로 분석하였다.

(4) 분석결과

(가) 검량선

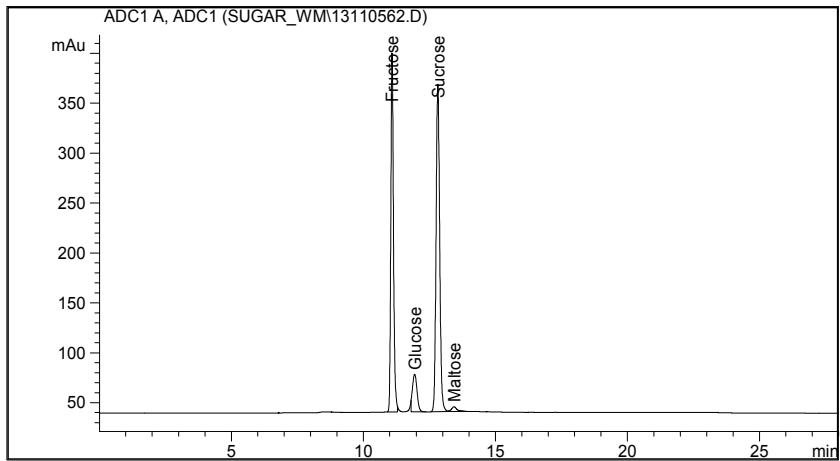


(나) 당 5종의 표준용액(100 ppm) 분석 결과 크로마토그램

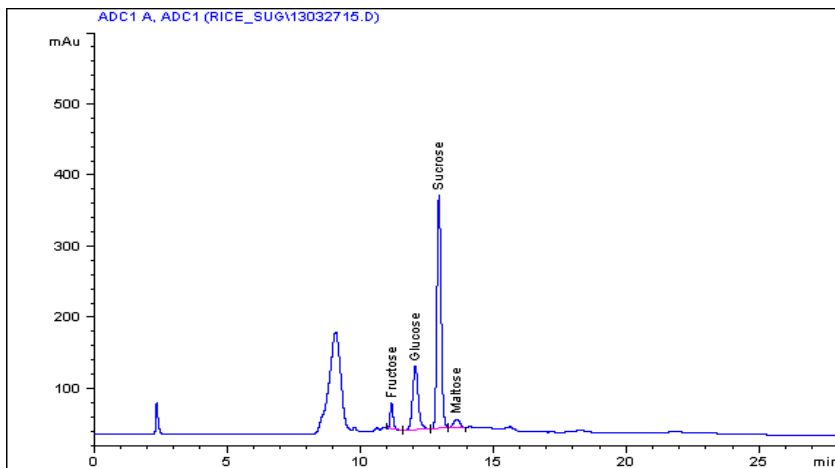


(다) 시료 분석 결과 크로마토그램

① 수박

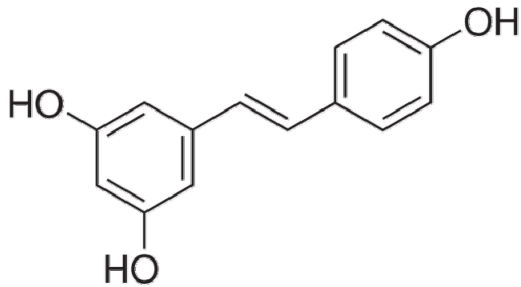


② 벼 종자



11. Resveratrol 성분 분석

(1) 분석물질 : Resveratrol



Resveratrol (C₁₄H₁₂O₃)

(2) 시험작물 : 포도, 포도주스, 와인, 땅콩나물

(3) Resveratrol 성분 분석법

(가) 시약 및 기구

- ① Analytical standard : Resveratrol (purity 99.6%), Fluka
- ② Methanol, acetonitrile : HPLC grade, Burdic & Jackson (USA)
- ③ 50 ml TPP tube, 2 ml, 20 ml amber vial
- ④ Ultrasonicator : BRANSON 5510
- ⑤ Balance : AND HM-200 Balance (Japan)

(나) 분석기기 및 분석조건

- ① Instrument : Shimadzu LCMS-8040
- ② Ionization and analyzer type : ESI(Electro Spray Ionization)
- ③ Column : Thermo Hypersil Gold aQ column (100 × 2.1 mm, 1.9 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Water + 0.1% formic acid
 - Solvent B : Acetonitrile + 0.1% formic acid
 - Gradient program

Time	% A	% B
0.0	5	95
2.0	5	95
5.0	10	90
7.0	10	90
7.1	5	95
8.0	5	95

- ⑤ Flow rate : 0.3 ml/min
- ⑥ Injection volume : 5 μ l

⑦ MS Analytical conditions

- DL temperature : 250 °C
- Heat block temperature : 400 °C
- Drying gas flow : 15.0 L/min
- Nebulizing gas flow : 3.0 L/min

(다) 검량선 작성

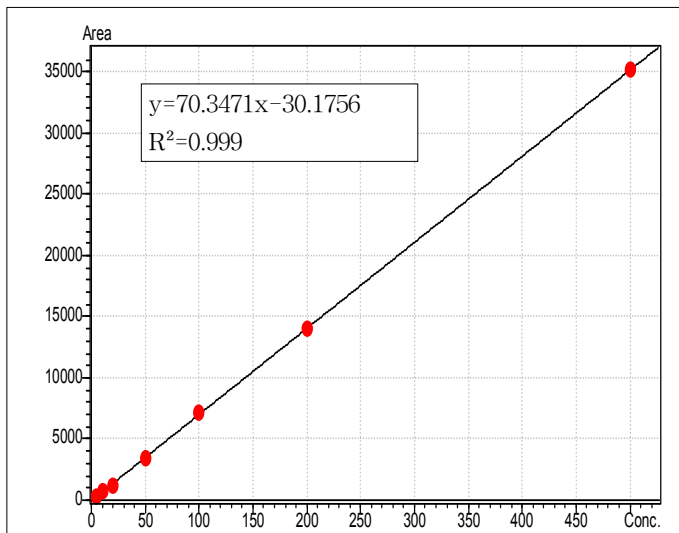
Resveratrol 표준품을 5 mg 칭량하여 methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 이 표준 혼합 용액을 80% methanol로 단계적으로 희석하여 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5 ppb 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 5 μ l씩 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

(라) 시료 추출

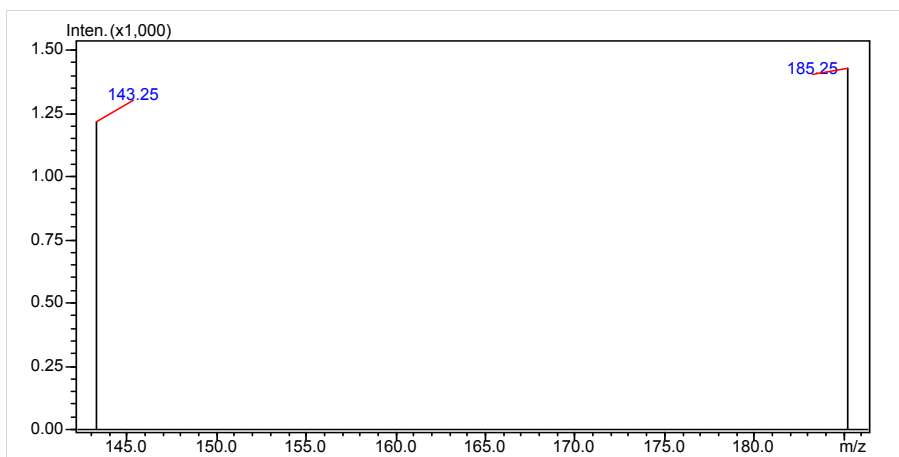
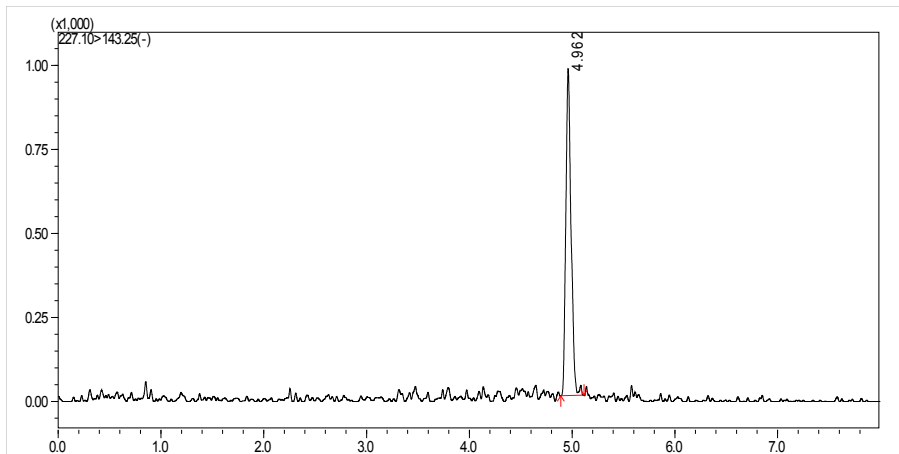
시료 1 g에 80% methanol 10 ml을 넣고 약 10초 동안 vortex하였다. 시료가 담긴 tube를 ultrasonicator에 넣고 1시간 동안 추출하였다(이때, 30분에 한번 vortex 해주었다). 추출물의 상층액을 0.2 μ m PTFE syringe filter로 여과한 다음 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 각 시료는 3반복 추출하였다.

(4) 분석결과

(가) 검량선

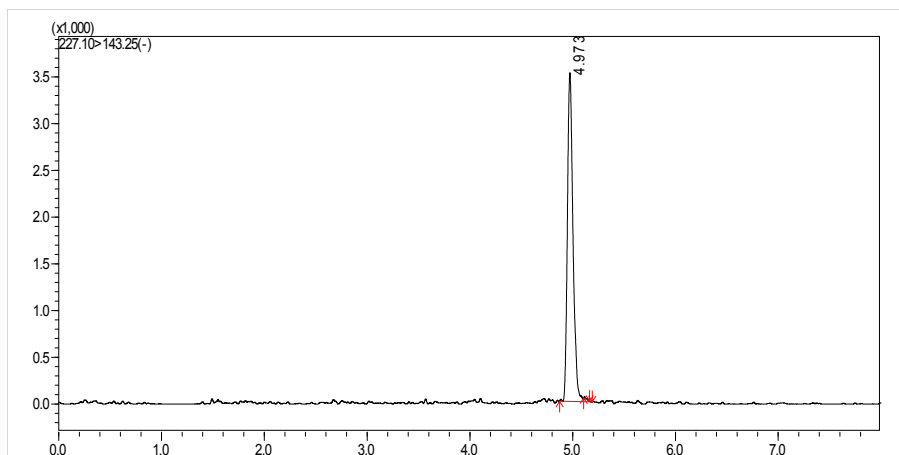


(나) Resveratrol 표준용액 (50 ppb) 분석 결과 크로마토그램 및 MS spectrum

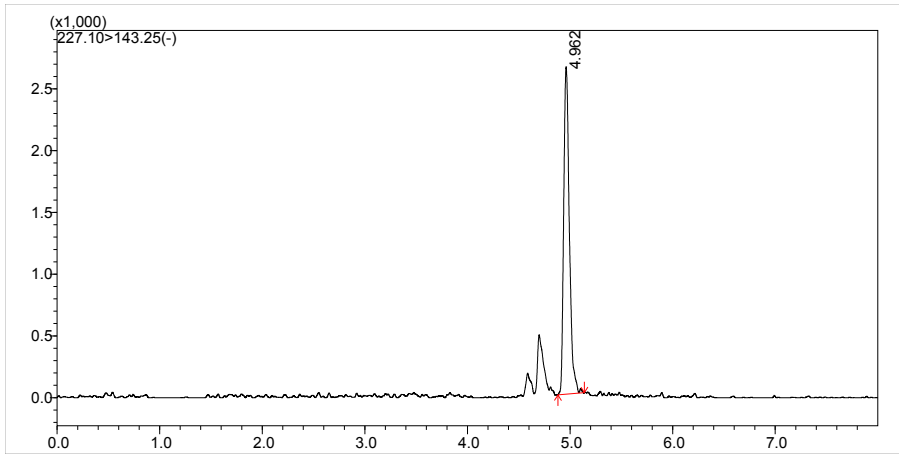


(다) 시료 분석 결과 크로마토그램

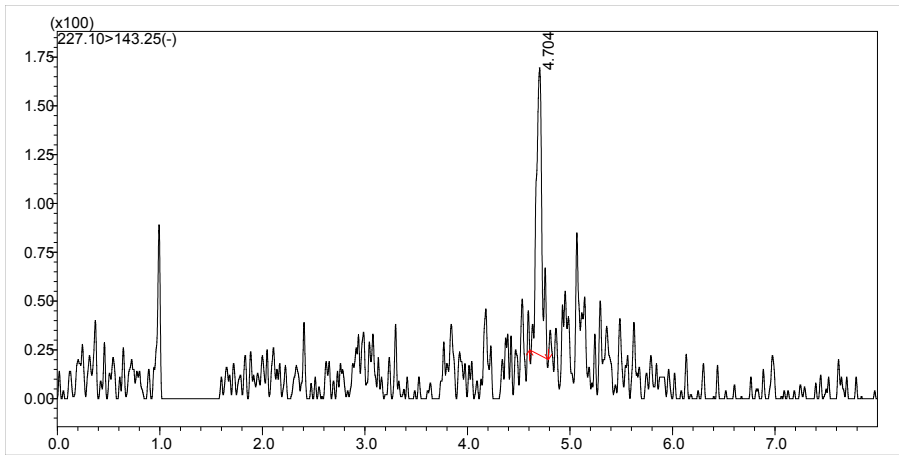
① 포도



② 적포도 주스

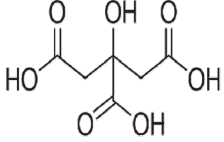
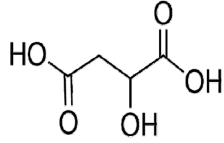
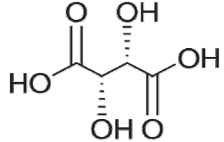
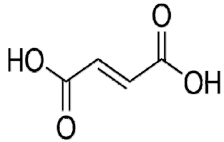
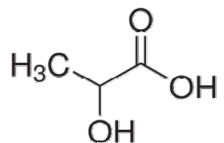
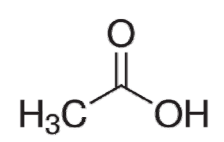
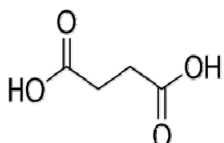


③ 포도 와인



12. 유기산(Organic acids) 성분 분석

(1) 분석물질 : 유기산 7종

유기산 종류	구조식
Citric acid (시트르산)	
Malic acid (말산)	
Tartaric acid (주석산)	
Fumaric acid (푸마르산)	
Lactic acid (젖산)	
Acetic acid (초산)	
Succinic acid (석신산, 호박산)	

(2) 시험작물 : 감귤, 포도, 사과 등

(3) 분석방법

(가) 분석기기 및 분석방법

- ① Instrument : HP1100 series
- ② Detector : UVD (Wavelength: 220 nm)
- ③ Column : Agilent XDB C18 (150 x 4.6 mm, 5um) +
YMC Pack ODS-A (250 x 4.6 mm, 3um)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : Acetonitrile

- Solvent B : Water + 3% phosphoric acid
- 99% B isocratic program

⑤ Flow rate : 0.5 mL/min

⑥ Injection volume : 20 μ l

(나) 검량선 작성

유기산 중 succinic acid, lactic acid, citric acid, acetic acid는 각 10 mg을 증류수 5 mL에 녹여 2000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였고, Tartaric acid와 malic acid, fumaric acid는 5 mg을 증류수 5 mL에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 각 표준용액은 일정 농도로 혼합하여 혼합표준용액을 만들고 5단계로 단계적으로 희석하였다[표 1]. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

표 1. 유기산 7종 표준용액 농도 (단위 ppm)

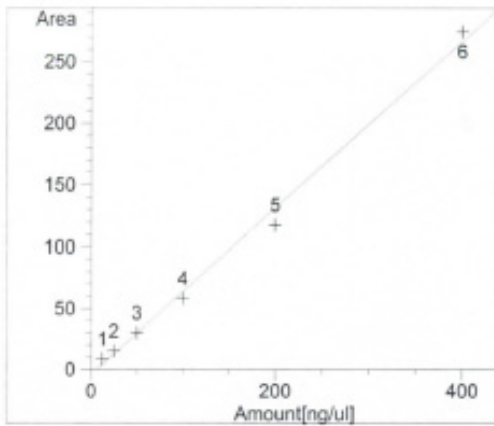
	Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Tartaric acid	3.125	6.25	12.5	25	50	100
Malic acid	6.25	12.5	25	50	100	200
Lactic acid	12.5	25	50	100	200	400
Acetic acid	12.5	25	50	100	200	400
Citric acid	12.5	25	50	100	200	400
Succinic acid	12.5	25	50	100	200	400
Fumaric acid	0.125	0.25	0.5	1	2	4

(다) 시료 추출

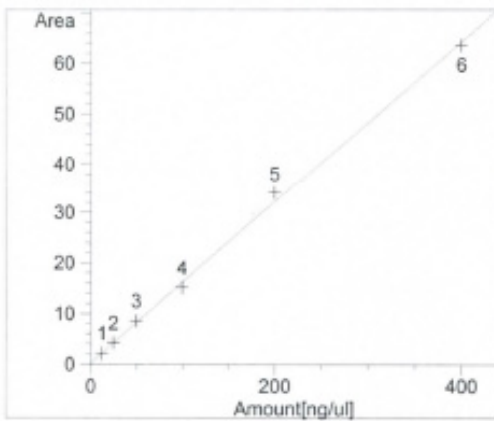
시료를 1 g을 50 mL 튜브에 담고 각각에 3차 증류수를 각 10 mL씩 부은 뒤 10분 동안 shaking해주었다. 추출물에 클로로포름용액을 10 mL씩 첨가 후 10분간 shaking하고 50°C에서 30분간 반응시켰다. 추출물을 원심분리기로 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다.

(4) 분석결과

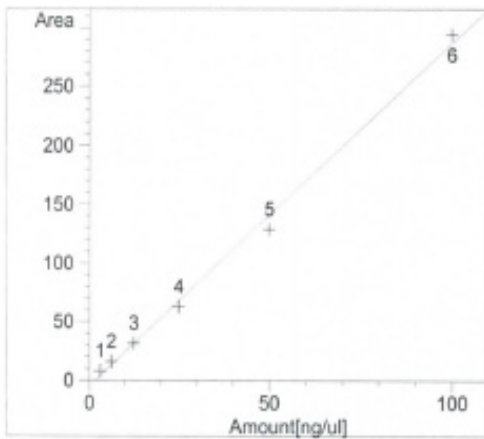
(가) 표준용액 검량선



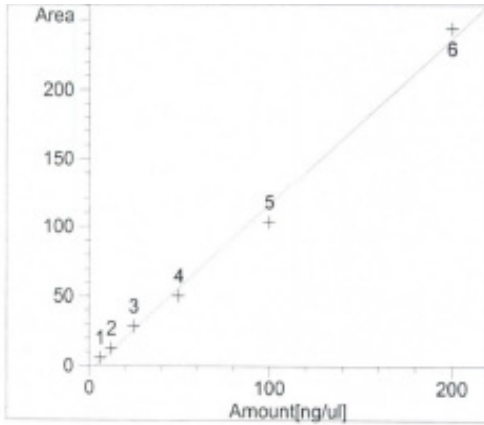
Lactic acid at exp. RT: 12.755
DAD1 B, Sig=220,8 Ref=off
Correlation: 0.99713
Residual Std. Dev.: 8.12272
Formula: $y = mx + b$
m: $6.77547e-1$
b: -4.18541
x: Amount [ng/ul]
y: Area



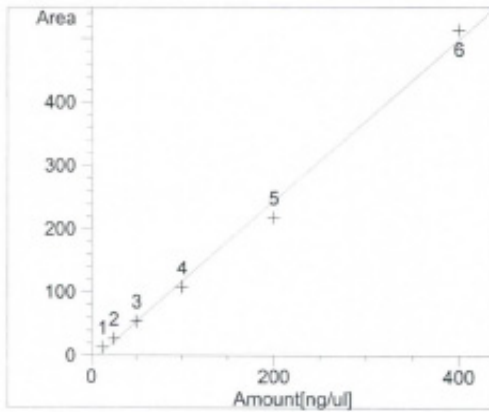
Acetic acid at exp. RT: 13.297
DAD1 B, Sig=220,8 Ref=off
Correlation: 0.99920
Residual Std. Dev.: 1.01235
Formula: $y = mx + b$
m: $1.60146e-1$
b: $2.17926e-1$
x: Amount [ng/ul]
y: Area



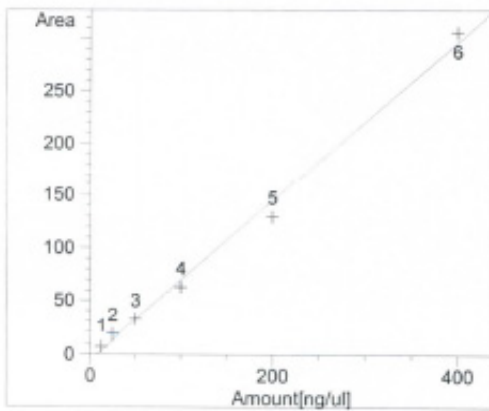
Tartaric acid at exp. RT: 9.580
DAD1 B, Sig=220,8 Ref=off
Correlation: 0.99790
Residual Std. Dev.: 7.47236
Formula: $y = mx + b$
m: 2.91861
b: -4.98554
x: Amount [ng/ul]
y: Area



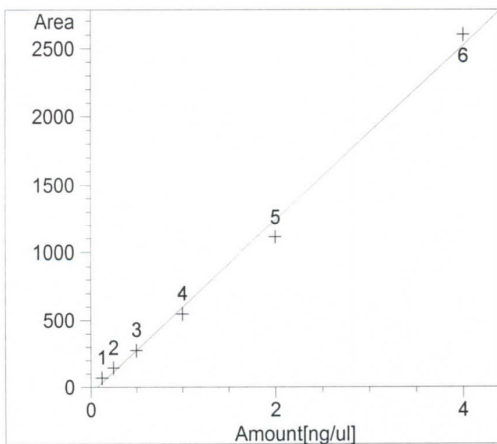
Malic acid at exp. RT: 10.934
 DAD1 B, Sig=220,8 Ref=off
 Correlation: 0.99684
 Residual Std. Dev.: 7.59145
 Formula: $y = mx + b$
 m: 1.20610
 b: -4.32340
 x: Amount [ng/ul]
 y: Area



Citric acid at exp. RT: 15.980
 DAD1 B, Sig=220,8 Ref=off
 Correlation: 0.99716
 Residual Std. Dev.: 15.13536
 Formula: $y = mx + b$
 m: 1.26997
 b: -9.49765
 x: Amount [ng/ul]
 y: Area

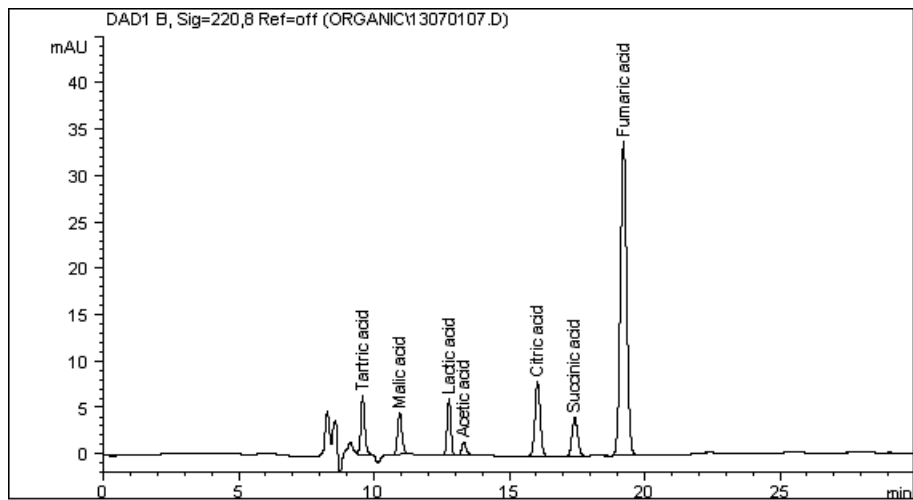


Succinic acid at exp. RT: 17.335
 DAD1 B, Sig=220,8 Ref=off
 Correlation: 0.99680
 Residual Std. Dev.: 9.57017
 Formula: $y = mx + b$
 m: 7.55462e-1
 b: -5.75691
 x: Amount [ng/ul]
 y: Area



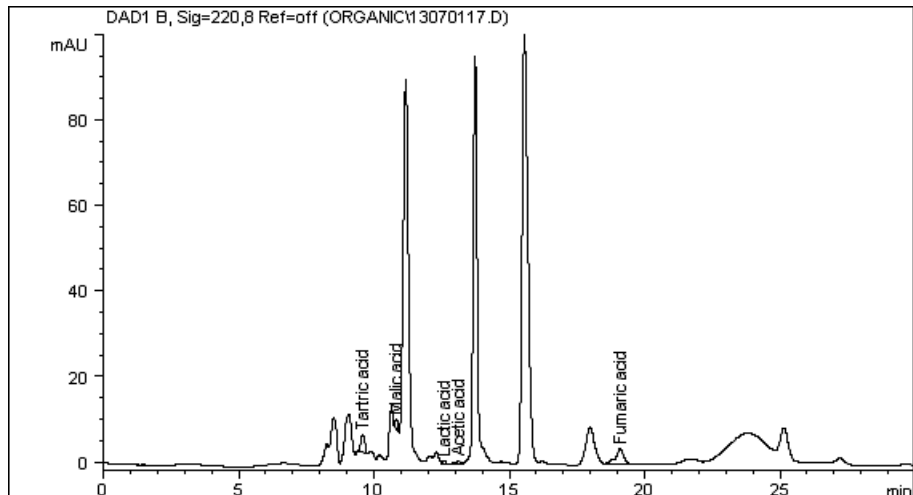
Fumaric acid at exp. RT: 19.173
 DAD1 B, Sig=220,8 Ref=off
 Correlation: 0.99711
 Residual Std. Dev.: 77.25582
 Formula: $y = mx + b$
 m: 642.61048
 b: -45.96300
 x: Amount [ng/ul]
 y: Area

(나) 유기산 7종의 표준용액(Level 3) 분석 결과 크로마토그램

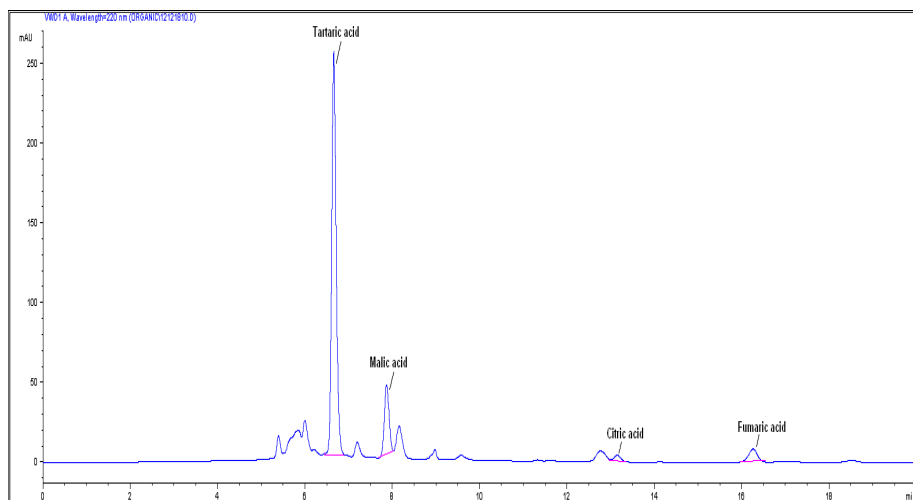


(다) 시료 분석 결과 크로마토그램

① 감귤



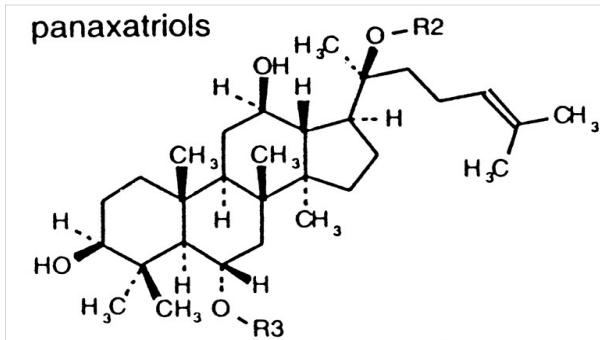
② 포도



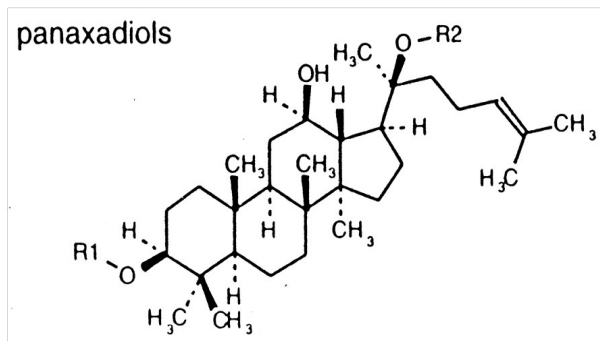
13. Ginsenosides 성분 분석

(1) 분석물질 : Ginsenosides 15종

(Re, Rg1, Rf, Rb1, Rc, Rd, Rb2, Rg2S, Rg2R, Rh1S, Rh1R, Rg3S, Rg3R, Rh2S, Rh2R)



Protopanaxadiol saponin	R2	R3	form
Ginsenoside-Re	-glc(2→1)rha	-glc	
Ginsenoside-Rf	-glc(2→1)glc	-H	
Ginsenoside-Rg1	-glc	-glc	
Ginsenoside-Rg2	-glc(2→1)rha	-H	20(S), 20(R)
Ginsenoside-Rh1	-glc	-H	20(S), 20(R)



Protopanaxadiol saponin	R2	R3	form
Ginsenoside-Rb1	-glc(2→1)glc	-glc(6→1)glc	
Ginsenoside-Rb2	-glc(2→1)glc	-glc(6→1)arap	
Ginsenoside-Rc	-glc(2→1)glc	-glc(6→1)araf	
Ginsenoside-Rd	-glc(2→1)glc	-glc	
Ginsenoside-Rg3	-glc(2→1)glc	-H	20(S), 20(R)
Ginsenoside-Rh2	-glc(2→1)glc	-H	20(S), 20(R)

(2) 시험작물 : 인삼

(3) 분석방법

(가) 분석기기 및 분석방법

① Instrument : HP1100 series

② Detector : UVD (Wavelength: 203 nm)

③ Column : Gemini NX C18 (250x4.6mm, 3um) + Gemini NX C18 (150x4.6mm, 3um)

④ Mobile phase

- Solvent A : Water
- Solvent B : Acetonitrile
- Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	80	20
2	80	20
42	0	100
47	0	100
50	80	20
60	80	20

⑤ Flow rate : 0.7 ml/min

⑥ Injection volume : 5 μ l

(나) 검량선 작성

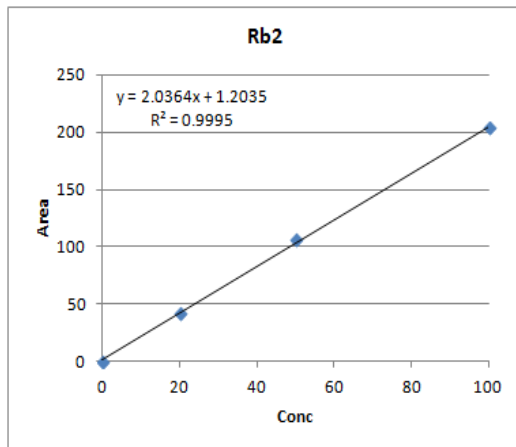
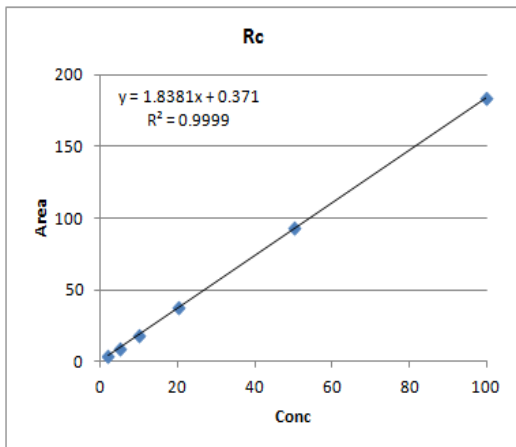
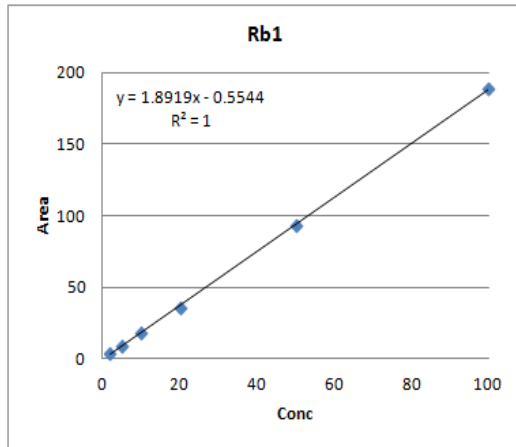
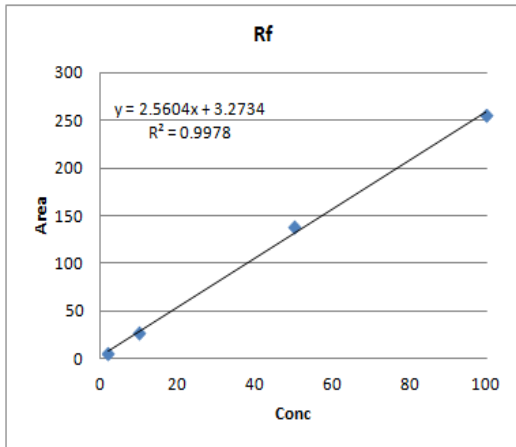
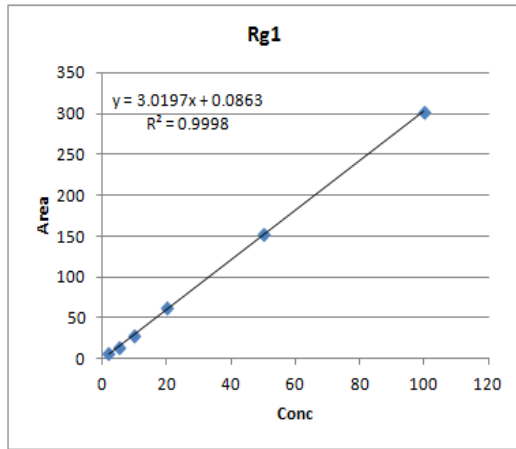
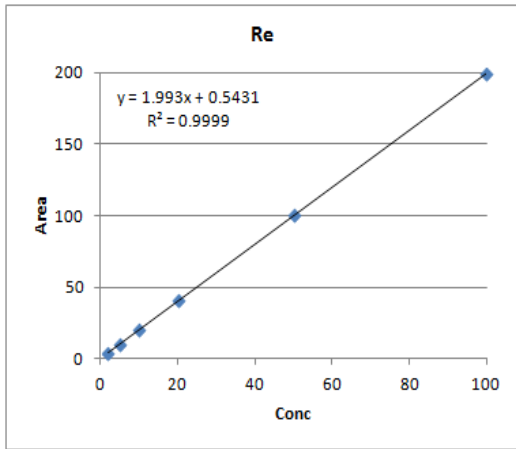
Ginsenoside 표준품 14종을 각각 5 mg 취해 100% methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Rg3R은 5 mg 취해 DMSO 200 μ l에 녹인 후 100% methanol 25 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 각 stock solution을 혼합하여 50 ppm working solution mixture를 만들고 methanol로 단계별로 희석하여 50, 20, 10, 5, 1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 5 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다[그림 35].

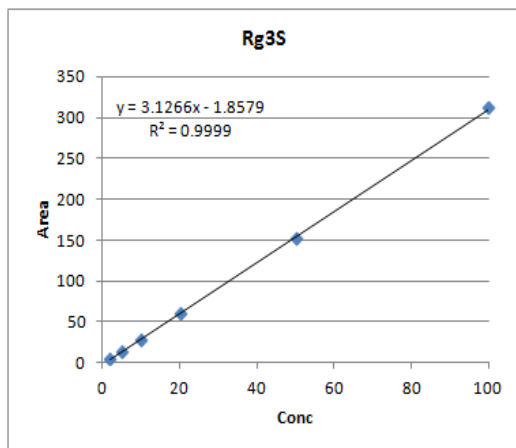
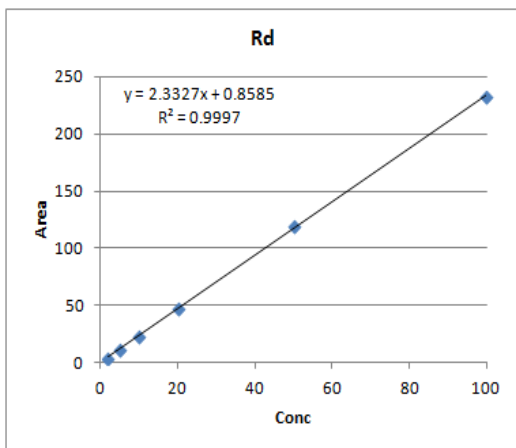
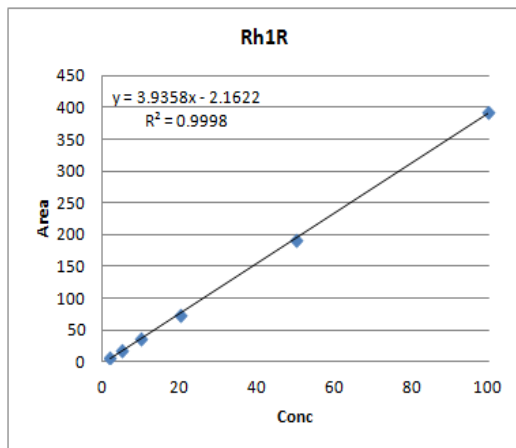
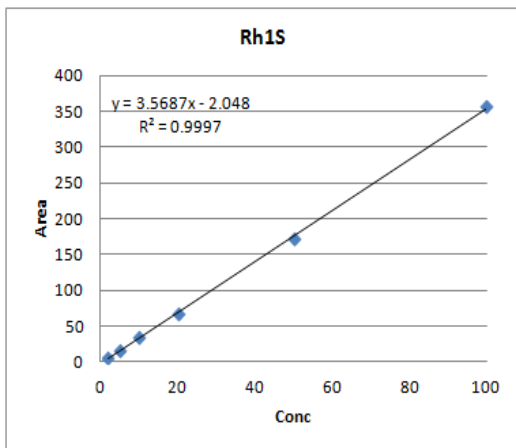
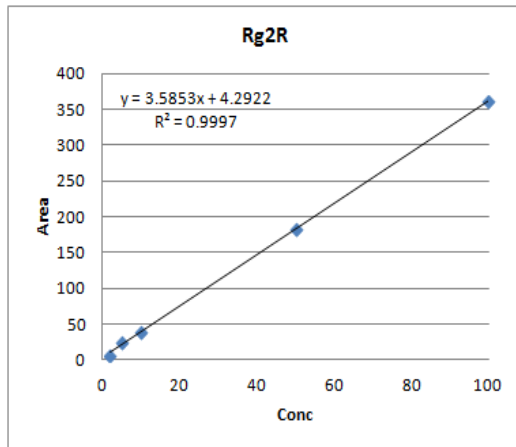
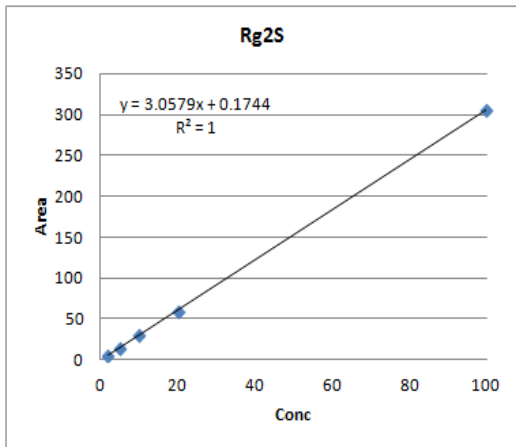
(다) 시료 추출

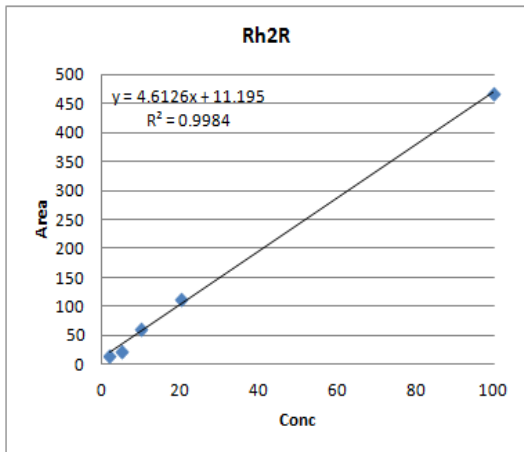
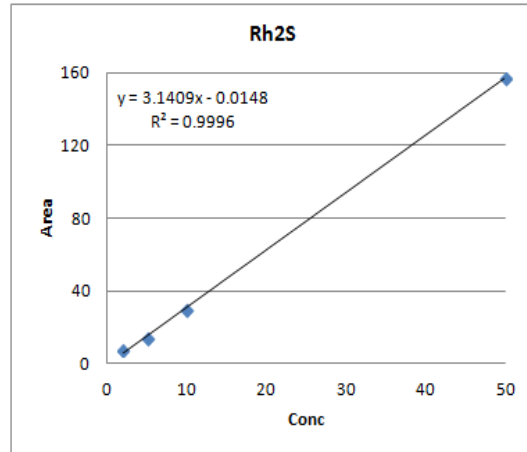
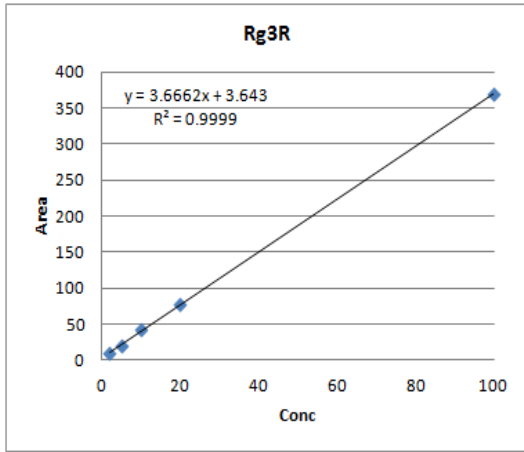
분쇄한 인삼 0.5 g에 70% methanol 10 ml를 가하고 ultrasonic cleaner에서 30분 동안 초음파 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액은 0.2 μ m RC syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 5 μ l씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

(4) 분석결과

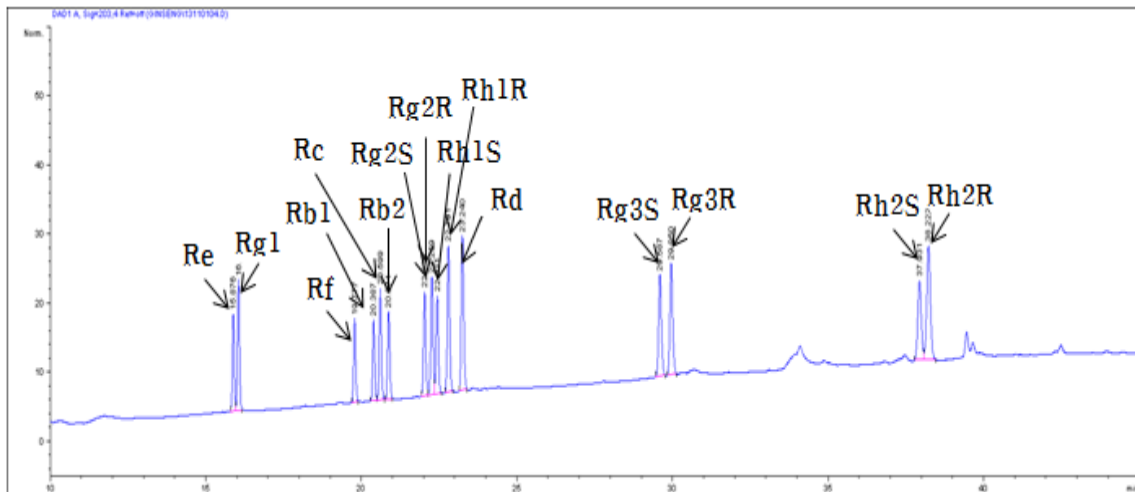
(가) 표준용액 검량선



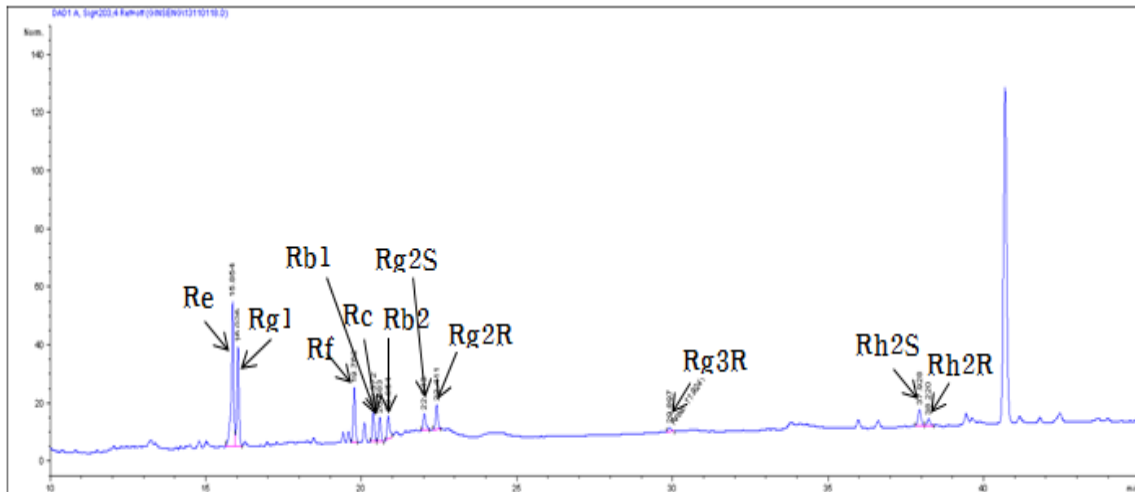




(나) 표준용액 분석 결과 크로마토그램

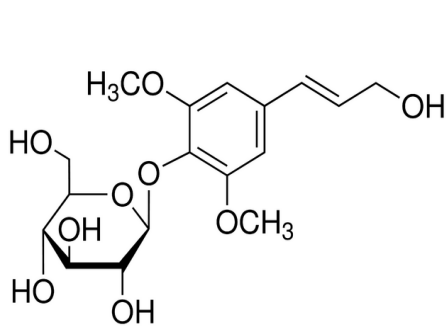


(다) 시료 분석 결과 크로마토그램

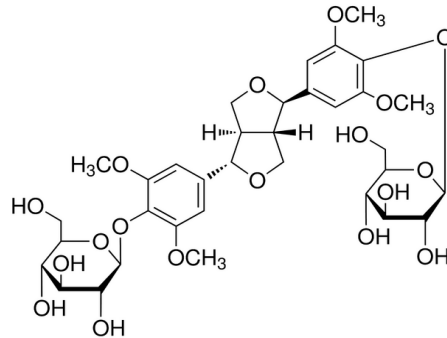


14. Eleutherosides 성분 분석

(1) 분석물질 : Eleutheroside B, Eleutheroside E



Eleutheroside B,



Eleutheroside E

(2) 시험작물 : 오가피류 (가시오가피, 당오가피, 지리산 오가피 등)

(3) 분석방법

(가) 분석기기 및 분석방법

- ① Instrument : HP1100 series
- ② Detector : Variable wavelength detector
- ③ Column : Kinetex C18 column (150 X 4.6 mm, 5 micron)
- ④ Mobile phase
 - Solvent A : DW
 - Solvent B : Methanol
 - Gradient program

Time (min)	%A	%B
0	90	10
3	90	10
23	50	50
25	20	80
30	20	80
32	90	10
40	90	10

⑤ Flow rate : 0.8 ml/min

⑥ Injection volume : 5 μ l

⑦ VWD timetable

Line	Time	Wavelength	Balance	Scan
1	0.0	220	x	Blank
2	10.0	220	x	Sample
3	15.0	210	x	Sample
4	20.0	210	x	Blank

(나) 검량선 작성

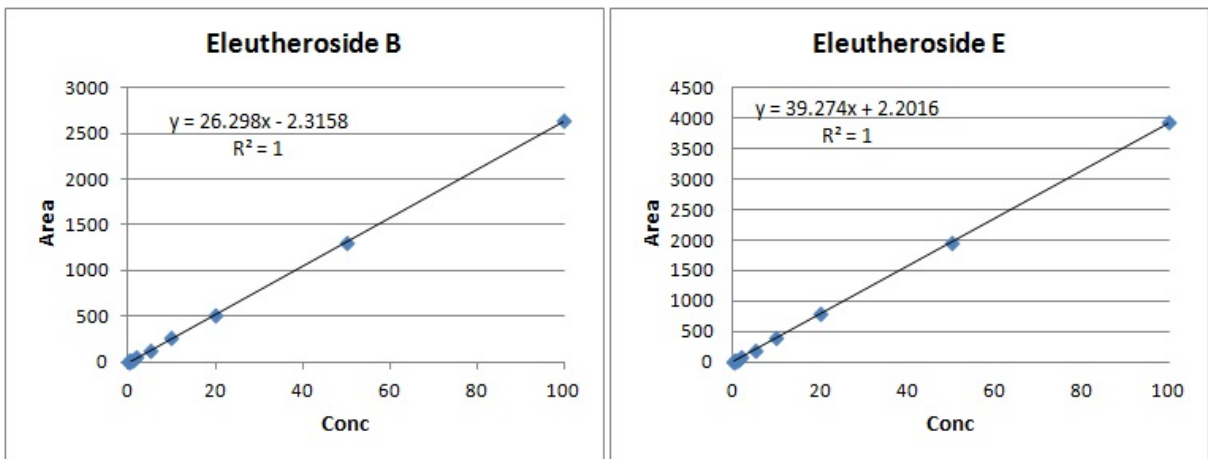
Eleutheroside B 표준품 5 mg을 100% methanol 5 ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Eleutheroside E 표준품은 5 mg에 60% methanol 5ml에 녹여 1000 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. 각 stock solution을 동량으로 혼합하여 100 ppm working solution mixture를 만들고 70% methanol로 단계별로 희석하여 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 ppm 용액을 조제하였다. 이와 같이 제조한 표준 용액을 각각 5 µl씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에서 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

(다) 시료 추출

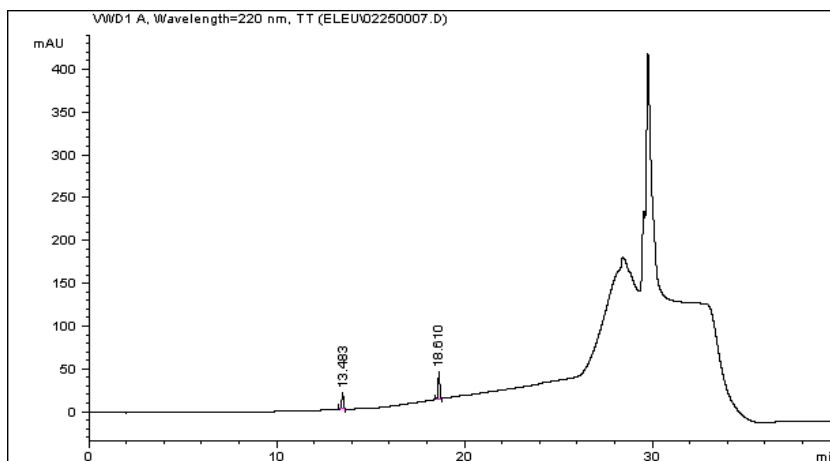
분쇄한 오가피 0.5 g에 70% methanol 10 ml를 가하고 ultrasonicator에서 30분 동안 초음파 추출하였다. 추출물을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액은 0.2 µm RC syringe filter에 여과하였다. 추출된 시료는 5 µl씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

(4) 분석결과

(가) 표준용액 검량선

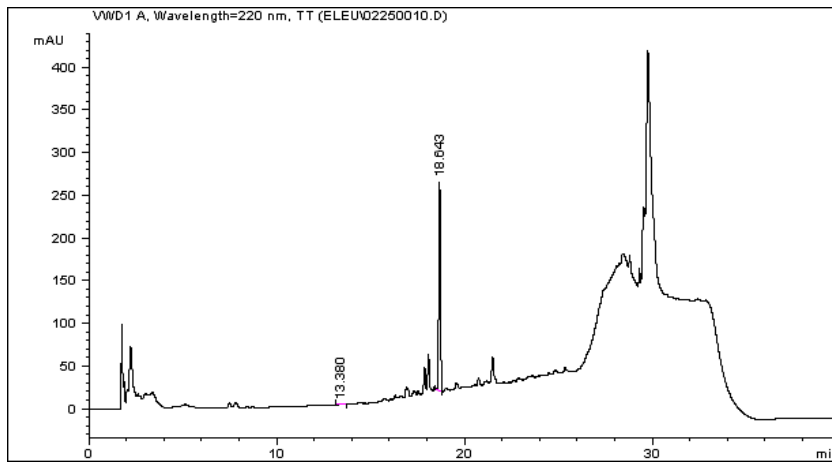


(나) 표준용액 분석 결과 크로마토그램

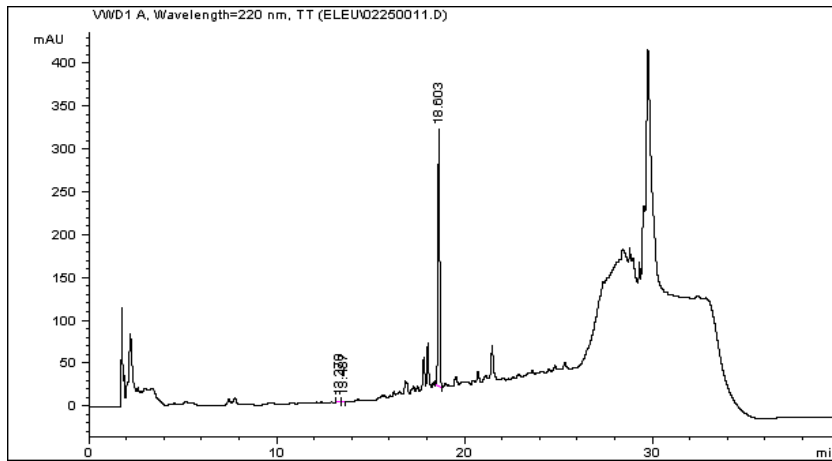


(다) 시료 분석 결과 크로마토그램

① 오가피 70% methanol 추출물 분석 결과 크로마토그램



② 인삼 70% methanol 추출물 분석 결과 크로마토그램

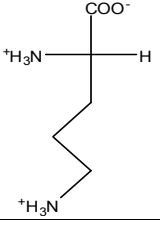
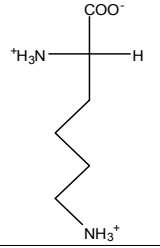
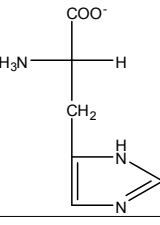
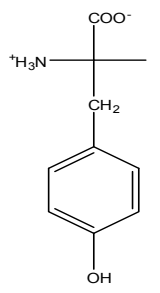
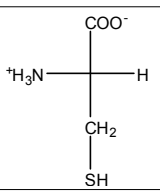
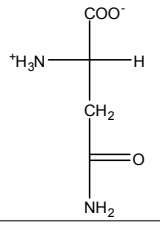
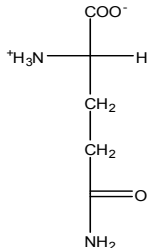


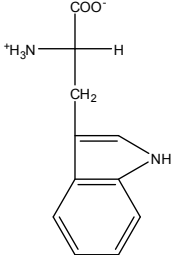
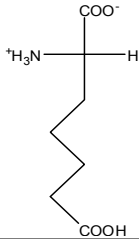
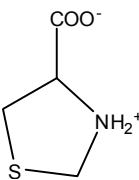
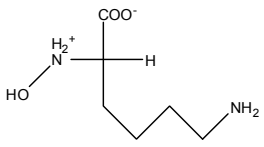
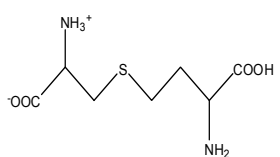
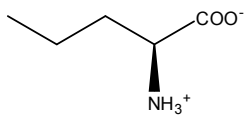
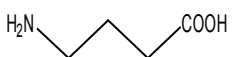
15. Amino acid 성분 분석

(1) 분석물질 : Amino acids

Abbreviation	Chemical Name	STRUCTURE
ALA	Alanine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{NH}_3 - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
SAR	Sarcosine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{HN} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} $
GLY	Glycine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{NH}_3 - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} $
ABA	α -Aminobutyric acid	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{NH}_3 - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array} $
VAL	Valine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{NH}_3 - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array} $
β -AIB	β -Aminoisobutyric acid	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 - \text{C} - \text{H} \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N} \end{array} $
LEU	Leucine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{NH}_3 - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array} $
ILE	Isoleucine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{NH}_3 - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array} $
aILE	Allo-Isoleucine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array} $

Abbreviation	Chemical Name	STRUCTURE
THR	Threonine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{NH}_3 - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $
SER	Serine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
PRO	Proline	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_2\text{N}^+ \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \end{array} $
ASP	Aspartic acid	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} $
MET	Methionine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \end{array} $
HYP	4-Hydroxyproline	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_2\text{N}^+ \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \end{array} $
GLU	Glutamic acid	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array} $
PHE	Phenylalanine	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $
AAA	α -Aminoadipic acid	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HOOC} \end{array} $

Abbreviation	Chemical Name	STRUCTURE
ORN	Ornithine	
LYS	Lysine	
HIS	Histidine	
TYR	Tyrosine	
C-C	Cystine	
ASN	Asparagine	
GLN	Glutamine	

Abbreviation	Chemical Name	STRUCTURE
TRP	Tryptophan	
TPR	Thiaproline	
APA	α -Aminopimelic acid	
HLY	Hydroxylysine(2 isomers)	
CTH	Cystathionine	
NORV	Norvaline	
GABA	γ -Amino-n-butyric acid	

(2) 시험작물 : 쌀 등

(3) 분석방법

(가) 분석기기 및 분석방법

① Instrument : Agilent GC 6890 + MSD 5973

② Detector : MSD 5973

③ Column : Zebron Capillary GC column (ZB-5MSi 60*0.25mm, 0.25um)

④ Injection : Split 1: 15, 250°C, 2 μ L

⑤ Oven temperature

Rate (°C)	Temp (°C)	Time (min)
-	80	2
2	200	2
10	320	10
Run time		87

⑥ Carrier gas : Helium, constant flow 1.0 mL/min

⑦ MS

- MS source : 230 °C
- MS quad : 180 °C
- Dwell time : 30 msec

(4) 분석결과

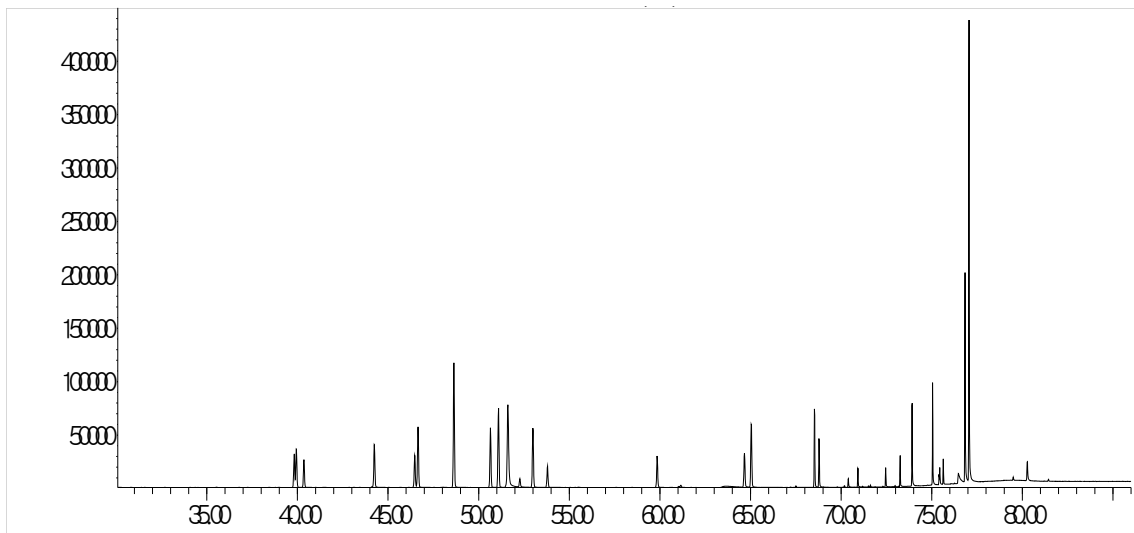
(가) 아미노산 종류별 retentio time과 SIM 이온

Abbreviation	Chemical Name	Retention Time (min)	GC/MS Major Ions Observed (SIM)
			Agilent 5973
SD1			
ALA	Alanine	39.831	130, 88
SAR	Sarcisine	39.949	130, 217
GLY	Glycine	40.369	116, 207
ABA	α -Aminobutyric acid	44.241	144, 102
VAL	Valine	46.476	158, 116
β -AIB	β -Aminoisobutyric acid	46.653	158, 116
LEU	Leucine	50.647	172, 86
ILE	Isoleucine	51.085	172, 130
aILE	Allo-Isoleucine	51.602	172, 130
THR	Threonine	52.259	160, 101
SER	Serine	51.500	146, 203
PRO	Proline	52.993	156, 243
ASP	Aspartic acid	65.022	216, 130
MET	Methionine	64.664	203, 277
HYP	4-Hydroxyproline	67.780	172, 86
GLU	Glutamic acid	68.768	230, 170
PHE	Phenylalanine	70.400	206, 190
AAA	α -Aminoadipic acid	70.920	244, 98
ORN	Ornithine	73.255	156, 70
LYS	Lysine	75.049	170, 128
HIS	Histidine	75.636	282, 168
TYR	Tryosine	76.839	206, 107
C-C	Cystine	81.449	248, 216
SD2			
ASN	Asparagine	53.792	155, 69
GLN	Glutamine	72.470	84, 187
TRP	Tryptophan	77.054	130
SD3			

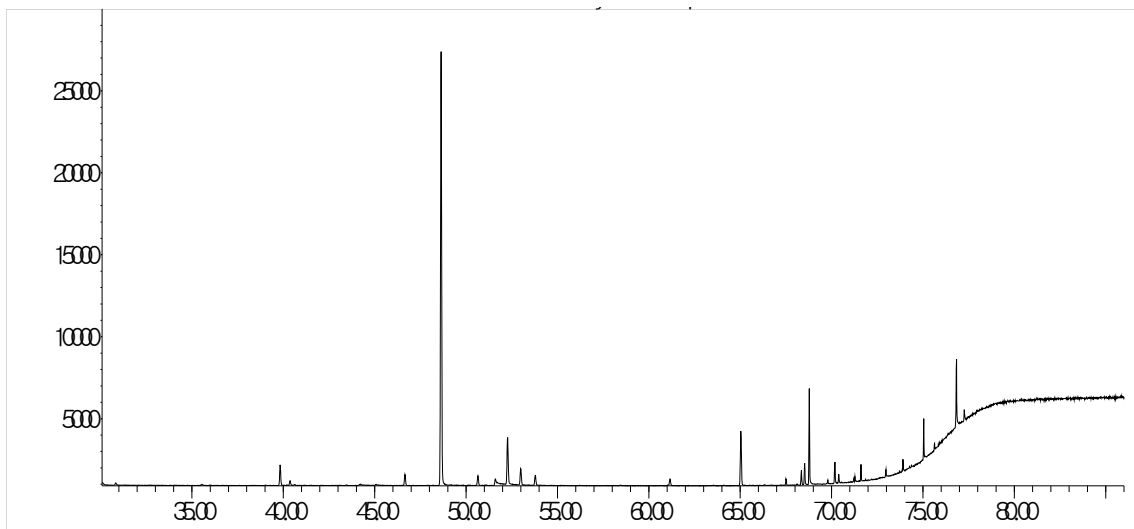
Abbreviation	Chemical Name	Retention Time (min)	GC/MS Major Ions Observed (SIM)
			Agilent 5973
TPR	Thiaproline	59.846	174, 147
APA	α -Aminopimelic acid	72.456	198, 258, 286
GPR	Glycine-proline(dipeptide)	73.260	70, 300
HLY	Hydroxylysine(2 isomers)	75.441	129, 169
PHP	Proline-hydroxyproline	76.480	156, 186
CTH	Cystathionine	80.281	203, 272
기타			
NORV	Norvaline	46.634	158, 72
GABA	γ -Amino-n-butyric acid	52.277	130, 144, 172

(나) 분석 결과 크로마토그램

① 표준용액 분석 결과 크로마토그램



② 시료(현미효소) 분석 결과 크로마토그램



< 7~13번 문항: 실험 실습 >

7. 실습 내용에 대해 전반적으로 만족하십니까? ()

- 1) 매우 만족한다 2) 만족한다 3) 보통이다 4) 만족하지 못한다

※ 4)의 경우 그 이유는 무엇이라고 생각하십니까?

()

8. 본 실습 과정의 난이도는 어느 정도라고 생각하십니까? ()

- 1) 매우 어렵다 2) 어렵다 3) 보통이다 4) 쉽다

※ 1), 2)의 경우 그 이유는 무엇이라고 생각하십니까?

()

9. 실습 기간, 장소, 환경 등을 고려 할 때 실습 인원은 적당하였습니까? ()

- 1) 아주 적당하다 2) 적당하다 3) 보통이다 4) 적당하지 않다

10. 실습 시간에 대해 어떻게 생각하십니까?()

- 1) 길다 2) 적절하다 3) 짧다 4) 모르겠다

※ 길거나 짧다고 답한 경우 적절한 기간은 어느 정도라고 생각하십니까?

()

11. 실습 조교들의 수업 내용은 적절하였습니까?()

- 1) 매우 적절했다 2) 적절했다 3) 보통이다 4) 부적절하다

※ 4)의 경우 그 이유는 무엇입니까?

()

12. 실습을 위한 교재는 잘 작성되었다고 생각하십니까?()

- 1) 매우 적절했다 2) 적절했다 3) 보통이다 4) 부적절하다

※ 4)의 경우 그 이유는 무엇입니까?

()

13. 실습 교육이 향후 본인의 업무에 도움이 될 것이라고 생각하십니까?()

- 1) 매우 도움이 될 것이다 2) 도움이 될 것이다 3) 보통이다

- 4) 도움이 되지 않을 것이다 5) 모르겠다

※ 4)의 경우 그 이유는 무엇이라고 생각하십니까?

()

14. 동일 업종에 종사하는 동료에게 본 교육과정 이수를 권하고 싶습니까? ()

- 1) 적극 권유 2) 권유 3) 아니다 4) 모르겠다

15. 본 교육과정을 이수한 소감이나 건의사항이 있으시면 자유롭게 기재해 주십시오.

[별첨 6] 작물육종지원사업단 지원 사업 설문지

작물육종 지원사업단 설문지

.....
작물육종지원사업단의 지원 서비스에 관한 설문지입니다.
.....

안녕하십니까?

작물육종지원사업단입니다.

그동안 본 사업단의 지원서비스가 여러분께 유익했기를 바랍니다.

본 사업단에서는 지난 2009년부터 현재까지(2009년 4월~2012년 3월 현재) 농림수산식품부 지원으로 분자마커 및 성분분석 서비스를 제공하였고, 그에 대한 여러분의 만족도를 알아보고 향후 개선방안을 마련하고자 아래와 같이 설문을 실시합니다.

서비스를 이용해 보신 경우와 그렇지 않은 경우에 따라 질문이 나뉘어 있으며, 이 설문 결과는 더 나은 지원 서비스를 위하여 소중한 쓰여질 것입니다.

본 사업단이 더욱 알찬 내용으로 여러분을 다시 만날 수 있도록 설문에 성심껏 응해주시면 감사하겠습니다.

응답 내용은 서비스 개선 방안에 반영될 것이며, 그 외의 목적으로 쓰이지 않을 것임을 알려드립니다.

작물육종지원사업단장 고희종

작물육종 지원 사업단 설문지

※ “(주)고추와 육종” 에서 실시하는 분자마커 서비스도 작물육종지원사업단 연구사업에 포함됨을 알려드립니다.

1. 귀하(귀사)는 본 사업단의 지원서비스를 이용한 적이 있으십니까?

- ①있다 (“있다”의 경우 → “2”번 질문으로 이동)
- ②없다 (“없다”의 경우 → 3페이지 “11”번 질문으로 이동)

=====

◆ 지원서비스를 이용해 보신 경우 ◆

2. 귀하(귀사)가 이용한 지원서비스는 무엇입니까?

- ① 분자마커 지원서비스
- ② 생화학성분분석 지원서비스

3. 본 사업단의 지원서비스를 접하게 된 경로는 무엇입니까?

- ①지인 ②지면 광고 ③광고 우편물 ④ 인터넷 ⑤ 타 기관 소개 ⑥ 기타()

4. 다음은 본 사업단의 지원 서비스 내용에 관한 질문입니다.

4-1) 본 사업단의 분석 기술 수준은 어떻다고 생각하십니까?

불만		보 통		만족
1	2	3	4	5

4-2) 시료 분석에 걸리는 시간은 어떻다고 생각하십니까?

불만		보 통		만족
1	2	3	4	5

4-3) 지원 서비스 분석료는 어떻다고 생각하십니까?

불만		보 통		만족
1	2	3	4	5

4-4) 서비스 과정 중, 상호간 정보 교환은 잘 이루어졌다고 생각하십니까? (의뢰를 맞길 때 또는 분석 과정 중 의사소통 정도)

불만		보 통		만족
1	2	3	4	5

5. 본 사업단의 지원서비스를 이용함으로써 품종 육성에 도움이 되었습니까?

아니다		보 통		그렇다
1	2	3	4	5

6. 현재 사업단의 분자마커 분석료는 아래와 같습니다. 이에 대하여 어떻게 생각하십니까?

분자마커 서비스	4,000 원/점	※ 점= 1샘플*1마커 ※ 고추마커의 경우는 분석료가 상이함 (4,950원/점).
----------	-----------	--

- ① 적절하고 이용 할만하다 ② 적절하나 많은 시료를 의뢰하기에는 부담스럽다 ③ 부적절하다

7. 현재 사업단의 성분 분석료는 아래와 같습니다. 이에 대하여 어떻게 생각하십니까?

성분분석 서비스	전처리	4,000 원/점
	기기분석	10,000 원/점
	계	14,000 원/점
	※ 성분별로 분석료 차이 있음.	

- ① 적절하고 이용 할만하다 ② 적절하나 많은 시료를 의뢰하기에는 부담스럽다 ③ 부적절하다

8. 위의 기준 분석료를 참고하시어 적정 분석 비용은 얼마라고 생각하십니까?

- 1) 분자마커 서비스 ()원/점
2) 성분분석 서비스 ()원/점

9. 만약 분석료가 적정 비용으로 조정된다면, 의뢰할 시료의 양은 얼마나 되십니까?

- 1) 분자마커 서비스 ()점
2) 성분분석 서비스 ()점

10. 다른 지원 센터나 사업단의 서비스를 이용하신 경험이 있으면 본 사업단과 비교하여 차이점 또는 개선점을 제시하여 주시고 기타 건의 사항이 있으시면 작성해 주십시오.

()

본 설문에 끝까지 응답해 주셔서 대단히 감사합니다. 앞으로 더 많은 도움을 드릴 수 있도록 열심히 노력하겠습니다.

◆ 지원서비스를 이용하지 않은 경우 ◆

11. 본 사업단의 지원서비스를 알고 계십니까?

- ① 잘 알고 있다 ② 모른다 ③ 들어 본적은 있다 ④ 타 지원서비스는 알고 있다

12. 현재까지 본 사업단의 지원서비스를 이용하지 않은 이유는 무엇입니까?

- ① 필요로 하는 서비스가 제공되고 있지 않아서 ② 불필요 하여 ③ 자체 분석이 가능하여
④ 사업단의 홍보 및 설명 부족 ⑤ 지원서비스에 대한 이해도 미흡 ⑥ 분석 비용

13. 귀하(귀사)가 가장 필요로 하는 지원 서비스는 무엇입니까(중복 선택 가능)?

- ① 분자마커 서비스 ② 성분분석 서비스 ③ 병리검정 서비스 ④ 기타()

14. 현재 사업단의 분자마커 분석료는 아래와 같습니다. 이에 대하여 어떻게 생각하십니까?

분자마커 서비스	4,000 원/점	※ 점= 1샘플*1마커 ※ 고추마커의 경우는 분석료가 상이함 (4,950원/점).
----------	-----------	--

- ① 적절하고 이용 할만하다 ② 적절하나 많은 시료를 의뢰하기에는 부담스럽다 ③ 부적절하다

15. 현재 사업단의 성분 분석료는 아래와 같습니다. 이에 대하여 어떻게 생각하십니까?

성분분석 서비스	전처리	4,000 원/점
	기기분석	10,000 원/점
	계	14,000 원/점
	※ 성분별로 분석료 차이 있음.	

- ① 적절하고 이용 할만하다 ② 적절하나 많은 시료를 의뢰하기에는 부담스럽다 ③ 부적절하다

16. 위의 기준 분석료를 참고하시어 적정 분석 비용은 얼마라고 생각하십니까?

- 1) 분자마커 서비스 ()원/점
2) 성분분석 서비스 ()원/점

17. 만약 분석료가 적정 비용으로 조정된다면, 의뢰할 시료의 양은 얼마나 되십니까?

- 1) 분자마커 서비스 ()점
2) 성분분석 서비스 ()점

18. 귀하(귀사)의 주요 대상 작물을 선택하시고 원하는 서비스를 작성하여 주십시오.

	작 물	원하는 서비스
예)	고추	capsaicin 성분 분석
예)	배추	순도 검정(분자마커)
가지과	고추, 토마토, 가지, 감자, 기타_____	
박과	수박, 참외, 오이, 멜론, 호박, 기타_____	
근채류	무, 당근, 기타_____	
엽채류	배추, 양배추, 브로콜리, 상추, 시금치, 기타_____	
산형백합과	양파, 파, 마늘, 기타_____	
특용, 약용	인삼, 기타_____	
식량	벼, 콩, 옥수수, 기타_____	
기타	버섯류, 땅콩, 기타_____	

19. 그 외 필요로 하는 서비스를 작물과 함께 구체적으로 작성하여 주십시오.

- ① 작물 :
- ② 서비스 :

20. 사업단의 지원 서비스 내용 관하여 또는 기타 질문 사항이 있으면 작성하여 주십시오.

본 설문에 끝까지 응답해 주셔서 대단히 감사합니다. 앞으로 더 많은 도움을 드릴 수 있도록 열심히 노력하겠습니다.