보안과제(　　), 일반과제(○)　과제번호: 106068-03

산삼 배양근의 DNA지문 부여 및 홍삼화를 통한 고품격화

(High-qualification of cultured mountain ginseng tissue by DNA fingerprinting and red-ginseng process)

공주대학교 산학협력단

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “산삼 배양근의 DNA지문 부여 및 홍삼화를 통한 고품격화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009년 4월 24일

주관연구기관명 : 공주대 산학협력단
주관연구책임자 : 정 기 화
세부연구책임자 : 류 기 형
연 구 원 : 박 선 화
연 구 원 : 기 염 청
연 구 원 : 강 성 희
연 구 원 : 조 은 민
연 구 원 : 양 혜 진
연 구 원 : N. Krittika

요 약 문

Ⅰ. 제 목 : 산삼배양근의 DNA지문 부여 및 홍삼화를 통한 고품격화

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

본 개발의 목표는 산삼배양근에 대해 변별력이 뛰어한 여러 SSR 좌위를 동시에 표기하는 DNA 지문을 개발하여 원 산삼근으로부터 유래했음을 99.99% 이상의 신뢰 수준으로 입증하며, 배양근을 압출성형공정으로 홍삼화하여 유용 성분의 강화로 고품격의 신기능성 '산삼홍삼 식품소재'를 개발하는 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

○ 높은 다형성의 SSR 마커 분리 및 인(산)삼 개체별 고유 DNA 지문 (ID) 개발

○ 압출성형공법으로 산삼배양근 분말의 산삼화 공정 확립

○ 고기능성・고품격 산삼홍삼 강화 식품 소재의 개발과 제품화

Ⅳ. 연구개발결과

○ 인삼의 유전체에서 251개의 SSR DNA 마커를 대량으로 분리하였으며, 12개의 다형성 마커와 화기삼과 구분되는 종간 특이 마커 15개를 찾았음. 아울러, 화기삼간의 종간 교차적용율은 94.8%로 매우 높았으며, 다중 동시증폭 PCR 시스템도 확립함

○ SSR 마커의 복합 유전자형을 이용하여 도출된 DNA ID의 변별력은 최저 10^{-4}에서 최대 10^{-14}까지 매우 우수함을 입증하였으며, 이를 간단하게 표현할 수 있는 2차원 DNA 바코드 표기법을 고안함

○ 압출성형공정으로 산삼배양근의 홍삼화 식품소재 개발에 성공하여 홍삼 특이 성분인 Rg_3가 검출되었으며, 아울러 산성다당체, 페놀성 화합물이 높은 농도로 검출되었음

○ 압출성형으로 홍삼화한 산삼배양근을 발효시켜 얻은 발효액은 항산화 기능과 항균활성 기능이 뛰어남을 확인함

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 지적재산권 5건(특허 등록 2건, 출원 2건, 상표등록 1건), 논문게재 6건(SCI급 3건, 학진등재 3건), 및 학회발표 8건의 실적 달성함. 향 후 1건 이상의 특허와 논문 2건 이상 발표 준비중임

○ 다형성 SSR 마커를 이용한 인삼류의 원산지 확인법의 적용 및 산삼배양근의 DNA ID의 바코드 표기법의 실용화로 유전적 계보가 확립된 산삼배양근 제품 개발

○ 압출성형 공정을 이용한 산삼배양근 분말의 홍삼화 기술 및 제작된 기능성이 강화된 식품 소재의 조기 상품화 추진

○ 산삼배양근의 홍삼화는 세계적으로 처음 시도되는 신기술로서, 개발품은 산삼과 홍삼의 좋은 이미지가 합쳐진 시너지 효과로 인삼 시장의 새로운 수요 창출은 물론 국제 시장의 선점 효과를 가져다 줄 것으로 기대됨

SUMMARY

Ⅰ. 제 목 : High-qualification of cultured mountain ginseng tissue by DNA fingerprinting and red-ginseng process

Ⅱ. Aims and necessity

The purpose of this study is mass-isolation of SSR markers from ginseng genome and development of DNA ID to certify the genetic lineage of cultured ginseng root (≥99.00%). We will also establish conversion method of cultured ginseng to red ginseng by the extrusion process and produce high functional food materials.

Ⅲ. Contents

○ Identification of hyper-polymorphic microsatellite (SSR) markers and development of DNA ID using combined genotypes of SSR

○ Establishment of red ginseng method by the extrusion process

○ Development of highly qualified and functional food materials using cultured mountain ginseng which is converted into red ginseng

Ⅳ. Results

○ we identified 251 novel microsatellite markers including 12 polymorphic markers and 15 interspecific polymorphic markers between *P. ginseng* and *P. quinquefolius*. The rate of inter-species cross transferency was high (94.8%).

○ 11 SSR haplotypes exhibited highly excellent discrimination power (10^{-4} to 10^{-14}). The DNA ID of SSR haplotype was expressed as 2-dimensional DNA bar-code.

○ From the extruded mountain ginseng, Rg_3 which is red ginseng specific compound was detected, and acidic polysaccharides and polyphenolic compounds were also detected as high concentrations.

○ We confirmed that the fermented extruded mountain ginseng is highly functional food materials as effective antioxidant and antibacterial source.

Ⅴ. Achievements and expected effects

○ Achievements: patents: 5(registration 2, application 2, trademark 1), publication: 6(SCI 3, others 3), academic presentation: 8.

○ Development of highly discriminative DNA ID and DNA bar-code. The DNA bar-code will be usefully applied to products of tissue-cultured mountain ginseng certified the genetic lineage.

○ The extruded mountain ginseng will be used as a very functionalized food materials as effective antioxidant and antibacterial source.

CONTENTS

제 1 장 Background of R&D ····· 11

제 1 절 Aims and necessity ····· 11

제 2 절 Contents of research ····· 14

제 2 장 Global situation of development ····· 16

제 1 절 Global situation ····· 16

제 2 절 Level of development ····· 17

제 3 장 Results ····· 18

제 1 절 Methods ····· 18

제 2 절 Development of DNA ID in ginseng ····· 26

제 3 절 Extrusion of ginseng root and development of high-functional food materials ····· 55

제 4 장 Achievement rate and contribution to related fields ····· 78

제 5 장 Achievements and application ····· 90

제 1 절 Patents, publications, and presentations ····· 90

제 2 절 Utilization and industrialization ····· 92

제 3 절 Education, and public relations ····· 93

제 6 장 Collection of oversea scientific and technical informations ····· 94

제 7 장 References ····· 95

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 11
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 ····· 11
제 2 절 연구개발의 범위 ····· 14

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 16
제 1 절 국내외 연구 현황 ····· 16
제 2 절 국내외 연구 수준 ····· 17

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 18
제 1 절 연구개발 방법 ····· 18
제 2 절 인삼류의 DNA 지문 개발 결과 ····· 26
제 3 절 압출성형 공정을 이용한 산삼배양근의 홍삼화 공정 및 고기능성 식품소재 개발 ····· 55

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 87

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ····· 90
제 1 절 특허, 논문 및 학회발표 성과 및 계획 ····· 90
제 2 절 실용화·산업화 실적 및 계획 ····· 92
제 3 절 교육·지도·홍보 및 기술확산 계획 ····· 93

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 94

제 7 장 참고문헌 ····· 95

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술의 경제적·산업적 중요성 및 필요성

○ 인삼은 건강증진과 몸 전체에 생기를 불어넣고 삶의 연장을 위해 이용되는 동양에서 최고의 효능을 가지고 있는 약초 중의 하나이다(Ellis and Reddy, 2002; Coleman et al., 2003). 진세노사이드는 인삼 뿌리에서 가장 중요한 효력이 있는 성분으로 심장보호, 면역조절, 몸의 활력증진, 간의 보호와 생리학적 및 약리적인 효력이 있다(Tang and Eisenbrand, 1992). 인삼이 포함하고 있는 미삼은 몇몇 보고된 사례에 의하면 정지세포와 부정근 뿌리보다 더 급속하게 성장하고 높은 함량의 진세노사이드가 생성된다(Inomata et al., 1993; Yoshikawa and Furuya, 1987).

○ 산삼은 깊은 산중에서 자생하는 야생인삼으로 천종, 지종, 인종, 장뇌로 분류한다. 천종, 지종, 인종은 야생의 인삼으로 조류가 종자를 먹고 배설하여 자연적으로 배양되며, 장뇌삼은 산삼종자를 산속에 뿌려 야생상태에서 인위적으로 재배한 것으로, 주로 그늘지고 습기가 많은 곳에서 잘 자란다(Jeong et al., 2005). 산삼은 약효가 뛰어난 것으로 알려져 있지만, 고가이면서 희귀성 때문에 국내에서 산삼은 재배 인삼과는 달리 체계적이고 과학적인 연구가 거의 없었다(Yoo et al., 2003).

○ 산삼은 희소성과 효능의 탁월성으로 고가로서 일반인이 접하기는 어려운 실정이지만, 최근 기내배양에 의한 산삼 부정근 조직의 대량생산이 가능해졌다. 즉, 생명공학 기술을 이용하여 pilot plant시설에서 대량의 산삼배양근이 생산되고 있으며 산삼배양근을 식품 및 제약 산업에 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

장·단점	내 용	대 책
장 점	재배삼에 비해 잔류농약 및 중금속 오염에 대한 우려가 없음	- 청결한 배양조건 유지
	대량 배양이 가능하므로 저가로 산삼 조직의 공급이 가능	- 신 소비층 개발을 위한 새로운 제품의 개발 노력이 요구됨
단 점	배양근의 성분 및 효능에 대한 불신이 존재함	- 우량 세포주 선별을 위한 지속적 노력 - 홍삼화를 통한 유용성분의 강화
	계대배양 배양근의 원 산삼근 유래에 대한 불신이 높음	- DNA 지문의 확인으로 계대배양 배양근의 진위성의 신속·정확한 검사

○ 구체적으로 산삼의 효능을 열거하기는 불가능하므로 산삼배양근의 연구결과를 근거로

하여 산삼의 효능을 추측할 수밖에 없는 실정이다(Hwang et al., 2006). 대체로 인삼보다 사포닌 함량이 높고 인삼에서 볼 수 없는 다양한 약리성분도 함유되어 있는 것으로 알려지고 있으므로 이를 이용한 다양한 제품개발이 시도되고 있다(Jeong et al., 2005). 그렇지만, 배양된 산삼 배양근에 대한 성분이 배양조건 및 계대배양 세포주에 따라서 성분의 차이를 보이며, 여전히 일부 부정적인 보고도 존재하므로 배양근의 성분에 대해서는 추가적인 검정이 필요한 상황이다.

○ 지금까지 산삼의 배양조건과 방법 등의 생산공정과 공정에 따른 성분변화, 효능 등의 연구가 진행되었으며 산삼배양근의 알코올발효에 대한 연구(Jeong et al., 2005; Yu et al., 2005)가 진행되었지만 2차 가공 중에서 압출성형을 통한 가공에 대한 연구는 시도되지 않았다.

○ 분말의 상태로 유통되는 산삼 배양근은 본 산삼의 형태를 확인할 수 없기 때문에 실제 원 산삼근으로부터 유래하였는지에 대한 의구심을 동반하고 있다. 그렇지만, 배양근은 일반인이 저렴하게 접할 수 있을 뿐 아니라 미생물, 중금속 및 잔류농약 문제를 해소할 수 있는 무공해의 장점도 있어, 산삼근 유래의 증명과 성분(효능)의 강화를 통한 고품격화로 활용가치를 높여야 할 것이다.

○ Microsatellite (Simple sequence repeat: SSR) 유전좌위는 농작물의 유전육종 및 근연종간 구분에 광범위하게 이용되고 있다. 최근 홍콩에서 거래되는 약재에 대한 SSR을 이용한 종 구분은 그 가능성을 보여 주었다. SSR을 이용한 유전자 감식은 지문처럼 사람마다 다른 초변이성 DNA를 분석하는 기술로 DNA지문법으로도 일컬어진다.

○ 최근 장뇌산삼의 대량 재배나 야생산삼의 기내 배양 부정근을 이용한 산업이 활성화되면서 인삼과 산삼의 구분은 물론 단일 개체의 유전적 식별(족보)을 표기하는 것이 대두되고 있다. 생물학적으로 인삼과 산삼은 동종(*P. ginseng*)이기 때문에 RAPD, AFLP, RFLP, SNP 법으로는 구분이 어렵다. 그렇지만, 본 연구에서 개발하고자하는 'SSR 10 좌위에 대한 하플로타이핑(haplotyping)'은 사람 식별의 법의학적 유전자감식의 원리를 적용한 것으로서 인(산)삼근의 개체 구분에 매우 유용한 'DNA ID'가 될 것이다.

○ 본 연구팀은 국내에서는 처음으로 인삼의 SSR 좌위를 수백개 분리하였으므로, 이를 이용하여 DNA ID를 개발하여 배양근과 원 산삼을 비교한다면, 계대 배양된 산삼근이 원 산삼으로부터 유래한 것인지는 쉽게 확인될 것이다. 즉, 배양근 생산에 사용된 원 산삼에 대해 고유한 DNA지문을 결정하고 보존하면서, 주기적으로 혹은 구매자의 요구가 있을 시에 계대배양된 배양근의 DNA지문과 비교하여 일치성 여부를 1-2일 이내에 정확하게 판정할 수 있다. 이 원리는 계대배양되는 배아줄기세포가 원래 체세포핵을 제공한 사람과 동일한 DNA지문을 가지는지를 비교하는 것과 같다.

○ 압출성형공정은 혼합, 분쇄, 가열, 성형, 건조와 같은 단위조작이 단시간에 일어나므로 다른 열처리 가공공정과 비교하여 효율적이고 경제적인 공정이다(Harper, 1989). 압출

성형공정은 원료투입속도, 수분함량, 스크루 회전속도, 사출구의 구조, 스크루 배열에 따라 목적하는 제품의 특성을 조절할 수 있기 때문에 다양한 특성을 가지는 제품을 생산할 수 있다(Meuser and Wiedmann, 1989).

○ 전통적인 홍삼의 제조공정은 수삼의 세척, 증자(90～100℃), 1차 건조(35～40%), 저장, 2차 건조(16%) 및 정형을 거치는 것으로 저장성 향상과 사포닌의 변화, 갈변화 등이 수반된다. 홍삼화 과정 동안 노화억제성분인 maltol이나 Rg3 등 20 여종의 새로운 약리효능 물질이 생성된다. 그런데 지금까지의 홍삼화 제조공정은 원래 형태를 유지한 본삼류를 대상으로 하므로 세근이나 배양근을 이용한 홍삼화는 불가능하였다.

○ 본 연구팀이 보유한 '압출성형공정을 이용한 홍삼화 기술'은 높은 수분함량과 낮은 온도에서 인삼을 홍삼화하고 팽화시키는 기술로 압출성형기에서 배양근이 증자, 성형을 거쳐 단시간에 홍삼화가 진행된다. 압출성형공정은 열과 압력처리가 동시에 인삼에 가해지므로 인삼전분의 호화 및 덱스트린화에 의한 소화율 향상, 사포닌, 산성다당체 등의 함량이 일반 홍삼보다 많은 장점이 있을 수 있다. 공정도 연속공정이므로 에너지 소비 및 홍삼화 비용도 절약될 수 있을 것으로 기대된다.

○ 인삼의 압출성형에 대한 연구는 수삼의 홍삼화를 위한 건조공정의 연구, 홍삼화에 따른 압출성형 공정변수의 영향과 최적화(Ha et al., 2004)에 대한 연구가 수행되었고, 가공공정을 달리하여 제조한 인삼제품의 성분비교(Ha and Ryu, 2005)에 대한 연구가 수행되었다. 압출성형 과정 중 발생하는 고온, 고압, 고전단력에 의해 수용성 성분의 추출이 용이해져 용해도가 증가한다.

○ 발효는 식품산업뿐만 아니라 식품의 감각적 특성을 향상시키고, 바람직하지 않은 영양성분을 제거하며, 영양소의 보존과 영양분의 특성을 향상시킨다(Jane et al., 2008). 또한, 인삼뿌리는 전통적인 한국의 술을 발효하는 동안에도 첨가된다(Han et al., 2006). Ann 과 Lee(1996)는 인삼박을 이용하여 알코올과 효모를 첨가하여 발효하는 연구를 진행하였는데 여기서 박은 효소의 당화 전에 발효기질로 사용되었다. 인삼주를 만들기 위한 미삼, 백삼과 홍삼 이용 가능성은 Roh 등에 의해 실현되었다(Roh et al., 2001). 그러나 산삼은 발효소재로서의 개발이 미흡한 실정이다.

○ 따라서 본 연구에서는 압출성형 공정을 이용하여 조직배양에 의해 생산된 산삼배양근을 홍삼화하여 부가가치를 향상시키고 새로운 고기능성 발효소재 또는 식품소재의 개발을 목적으로 압출성형 산삼배양근을 발효시키고, 이에 따른 산삼배양근의 이화학적 특성의 변화를 연구하는 매우 중요하다 하겠다.

제 2 절 연구개발의 범위

구 분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도 (2006)	○SSR-enriched library로부터 SSR 서열의 분리	○ 인삼 SSR-enriched library 스크린 - White colony random selection - Plasmid 분리 및 insert 확인 ○ 염기서열분석법을 이용한 SSR 서열의 동정 - Big-dye termination kit를 이용하여 염기서열결정 - SSR 반복 motif의 탐색 ○ SSR motif PCR 증폭조건 결정 - SSR 서열 특이적 primer 제작 - PCR cycling 조건 확립 ○ Genotyping 수행: 변성 PAGE 실시	- Plasmid 분리: 2,000 cfu 이상 - 0.1-1kb 선별 - 2,000 plasmid 이상 서열 분석 - 500개 이상의 SSR motif 분리 - 100 SSR 이상 PCR법 확립 - Genotyping
	○배양근 분말의 홍삼화를 위한 압출성형공정의 최적 조건 확립	○ 수분함량, 배럴의 온도분포, 스크루 회전속도(체류시간의 조절) 등의 공정변수에 따른 홍삼화와 효율 및 제품의 특성 ○ 사출구(die)의 구조와 스크류 배열 등과 같은 압출성형기에 따른 배양근 분말의 홍삼화 효율 특성 ○ 홍삼화 최대효율을 목적변수로 하는 압출성형시스템의 최적화	- 수분함량 40% 이하 - 최대온도 150℃ 이하
2차년도 (2007)	○변별력이 높은 SSR 마커의 개발: 품종별-특이 좌위의 분리	○ 1단계 다형성 SSR 좌위의 선별 - 타이핑 결과가 뚜렷하면서 종간 종내 변이성을 보이는 좌위 선별 ○ 2단계 다형성 SSR 좌위의 선별 - 1단계 선별 좌위에 대해 시료를 50개 이상 늘려서 타이핑 실시 ○ 재현성과 근연종간의 적용 ○ 최종 선별된 다형성 SSR 좌위의 특성화 - 대립유전자 반복서열 구조결정	- 1단계: 50좌위 이상 선별 - 2단계: 20좌위 이상 선별 - 다형성이 매우 높은 좌위 분리

		- 각 대립유전자의 명명, 종류 및 빈도 결정	
	○산삼배양근 압출성형 시스템의 scale-up 및 홍삼 기능성 식품 소재화	○ 압출성형 시스템의 scale-up을 위한 data의 수집 (공정변수 및 배럴내부 증기압 프로파일 등) ○ 공정변수에 따른 홍삼성분의 변화 및 기능성 성분의 파괴의 최소화 모델링 ○ 압출성형공정변수의 변화에 따른 압출성형 홍삼화 배양근의 추출 및 침출패턴의 분석	- 압출성형반응기 용량 50 kg/hr - 홍삼의 유효성분과 비교
3차년도 (2008)	○ 인(산)삼 개체별 고유 DNA 지문 (ID) 개발	○ 선별된 좌위의 신속한 분석법확립 - FAM, HEX, VIC으로 형광 표지 및 Automatic sequencer를 이용한 타이핑 ○ 11 SSR의 유전자형 haplotype으로 산삼 개체별 고유 ID 확립 - 인삼/화기삼 등 종간 및 인삼/산삼 등 종내 DNA 지문법 ○ 인삼 microsatellite 마커 정보의 등록 및 데이터베이스 구축 ○ 원 산삼 개체별 ID의 바코드화	- 타이핑의 자동화 - 24hr 이내 분석 -변별력≥99.99% - 계대배양 세포주에 대한 DNA지문 대조
	○ 생산용 배양근 홍삼화 시스템과 홍삼화 중간소재를 활용한 제품의 개발	○ 생산용 압출시스템 변수가 홍삼화와 제품성질에 미치는 영향 및 압출성형공정 변수의 최적화 ○ 산삼 배양근의 고온고압 압출성형를 통한 유효성분의 반응과 추출수율의 향상 ○ 효소처리 및 발효를 활용한 유효성분의 반응 및 추출효율의 향상 ○ 산삼 배양근을 이용한 고품격·고기능성 식품	- 수분함량, 온도분포, 체류 시간의 최적화 - 압출성형 배양근 홍삼의 추출율 및 기능성 소재화 디자인

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 연구 현황

1. 국외 현황

○ SSR 좌위는 식물의 유전육종, 신규 기능성 유전자의 분리 및 근연종간 구분에 광범위하게 이용되고 있다. Hon 등(2003)은 홍콩에서 거래되는 약재에 대한 microsatellite의 유전적 마커를 이용한 분류를 시도하여, 고려인삼과 미국 화기삼이 microsatellite로 구분이 가능할 수 있음을 시사하였다.

○ 중국은 벼에 대한 SSR 연구를 국립벼연구소와 대학을 중심으로 심도있게 진행하고 있다. 유전학 연구소 (Wuhan University)에서는 벼 35 품종간의 유전적 다양성을 microsatellite의 분석으로 실시하였으며, Yan 등(2003)은 벼알의 형태에 영향을 주는 QTL과 연관된 다수의 microsatellite 마커를 분리하여 염색체 지도를 작성하였다. Li 등(2003)은 두 종류의 벼 품종 (indica and japonica)을 대상으로 1,844 SSR을 분리하고 종하위 단위간의 유전체의 비교연구에서 SSR이 유용할 수 있음을 제안하였다.

○ 일본의 Fujino 등(2003)은 벼의 저온발아를 조절하는 QTL (quantitative trait loci controlling low-temperature germinability)을 동정하기 위한 SSR의 염색체 지도를 작성하였다.

○ 독일의 "Institute of Plant Genetics and Cop Plant Research"에서는 보리를 포함한 주요 농작물의 새로운 SSR과 SNP를 동정하고 있다. "Research Institute of Plant Production (Slovakia)"는 식물 유전자원을 수집하고 보호하는데, barley, soybean, chickpea, alfalfa와 같은 주요 농작물들에 대한 품종간의 microsatellite 마커의 분석을 주요한 업무로서 수행하고 있다.

○ Missouri 대학의 "Maize Project 팀"은 미국의 주요 농작물인 옥수수의 SSR 마커를 개발하고 염색체 연관지도를 작성하여 관련 자료들을 Maize DB (www.agron.missouri.edu)를 통해 제공하고 있다.

○ "이탈리아 포도연구소"를 중심으로 각 지방 포도시험장과 대학에서는 포도 품종 동정 연구를 위해 동위효소와 단백질 검정과 아울러 SSR 분석을 통한 유전학적 검정에 대한 연구를 수행하고 있다.

2. 국내 현황

○ 강원대학교 Yu 등(2003)은 가시오가피의 종내 유연관계를 연구하여 87개의 polymorphic RAPD marker를 동정한 바 있다.

○ 영남대학교 Chen 등(2004)는 생명공학연구소에서는 동북아에 분포하는 소의

microsatellite 마커의 집단유전학적 연구를 통해 각 집단의 유전적 다양성을 조사한 바 있다. 아울러, 영남대학교에서는 형질전환 벼의 유전자가 야생 유사 종으로서의 gene flow 빈도를 결정하기 위해 SSR을 이용하였다.

○ 국내에서 가장 중요한 약용작물인 인삼에 대한 microsatellite에 대한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구를 통해 인삼에 대해서는 처음으로 밝혀질 microsatellite 마커들은 48개나 되는 염색체의 지도 작성에 큰 도움이 될 것이다.

○ Ryu와 Remon(2004)은 압출성형공정을 적용하여 사출구 온도 130℃와 수분함량 15%, 스크루 회전속도 250 rpm에서 압출성형한 수삼이 원료 백삼과 비교하여 수용성물질의 추출수율이 약 2배 정도 향상되었다고 보고하였다.

○ 압출성형공정은 고온, 고압하에서의 가공공정이며 스크루 회전에 의한 전단력이 원료에 작용하여 세포벽의 파괴와 함께 전분의 호화가 일어나 추출속도가 증가한다는 연구결과가 발표(Kim and Ryu, 2005)되었지만 압출성형공정을 이용한 산삼배양근을 홍삼화하기 위하여 압출성형 공정변수에 따른 이화학적 특성 및 침출특성과 같은 연구는 수행되지 않았다.

제 2 절 국내외 연구 수준

1. 세계적 수준

개념정립 단계	O	기업화 단계		기술 안정화 단계	

2. 국내수준

개념정립 단계	O	기업화 단계		기술 안정화 단계	

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 산삼배양근은 ㈜씨비엔바이오텍(충북 청원)에서 구입하여 사용하였고 4년근 홍삼분말, 백삼분말, 백삼미세근, 홍삼미세근은 ㈜동진제약(충남 금산)에서 구매하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약은 Sigma사에서 구입한 특급 분석시약을 사용하였다.

발효에 사용된 누룩은 *Aspergillus usamii*와 *Rhizopus japonicus*가 포함된 바이오 누룩(Korea enzyme, Hwaseong, Korea)을 사용하였으며, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* (Korea enzyme)를 사용하였다.

2. pGEM-T library의 스크린

가. colony의 선별, 플라스미드 분리 및 SSR 서열의 확인

Library (대장균)를 X-GAL이 포함된 한천배지에 plating한 후, white colony들을 random selection한다. 각 클론으로부터 pGEM-T 플라스미드를 분리하고, automatic sequencer(ABI 3100)를 이용하여 삽입된 genome DNA 단편의 정확한 염기서열을 결정하고 SSR 서열의 위치와 특징을 분석하였다.

나. SSR 증폭을 위한 primer 디자인

Primer는 기본 반복단위가 5번 이상이 되고 반복 지역 전후에 충분한 보존 서열을 갖는 좌위들에 대해 제작하였다. Primer의 길이는 20-24mer 내외의 길이로 T_m이 58℃ 이상이 되게 제작하였다. PCR 수행 후 단편의 길이는 100-400 bp의 범위에 있게 primer 위치를 결정하였다.

3. SSR 마커의 Genotyping

가. SSR 마커의 증폭

PCR은 일반적인 방법으로 실시하고 PCR 반응이 끝나면, agarose gel (FMC)에서 전기영동을 통해 단편의 크기를 결정한다. 증폭 DNA의 정확한 대립유전자형을 결정하기 위해서는 DNA 단편의 염기서열을 확인하여 결정하였다. FAM-, HEX-, NED- 및 VIC-labeled primer를 사용하여 증폭한 PCR 산물은 automatic sequencing analyzer (ABI 3100)로 분리한 후 Genotyper (NT, Ver. 3.7)로 유전자형을 분석하였다.

나. SSR 증폭 DNA의 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동

Non-labeled primer로 증폭된 SSR 증폭물은 denaturing polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다. Acrylamide 용액(A:Bis=19:1)을 이용하여 5% acrylamide, Urea 7 M 및 1X TBE의 겔을 T0.4 mm X L40 cm의 크기로 준비하였다. DNA 용액은 SSR 2X loading buffer와 1:1로 혼합하고, 전기영동은 40 mA의 일정한 전류에서 3-5시간 실시하였다.

다. Silver staining

SSR 전기영동 겔의 silver staining은 DNA silver staining system (Promega)를 이용하여 실시하였다. SSR 증폭물의 폴리아크릴아마이드 전기영동이 끝나면, 겔을 10% ethanol에 20 분간 고정시킨 후, 1% HNO_3 용액에 10 분간 담그고, 이어 staining solution (Silver nitrate 1 g, 37% formaldehyde 1.5 ml/1 L)에 30분간 부드럽게 흔들어 준 후 DW로 가볍게 헹구어 주었다. 다음에 developer solution (Sodium carbonate 30 g, 37% formaldehyde 900 µl, 1% Sodium thiosulfate 500 µl/1 L)을 처리하여 밴드가 나타날 때까지 둔 후, 10% acetic acid로 반응을 중단시켰다.

4. Multiplex PCR 시스템 및 haplotype ID 개발

가. Multiplex SSR PCR 시스템의 개발

분리된 SSR 마커들의 동시 증폭을 위한 'multiplex PCR 증폭 시스템'을 개발하였다. Kit는 판독력이 우수한 automatic sequencer로 분석할 수 있게끔 primer를 FAM, HEX, NED, VIC으로 표지시키고, 증폭물의 크기가 서로 중복될 경우는 서로 다른 Big-dye로 표지시켰다. Multiplexing은 tri-hexaplex 중심으로 개발하며, 각 primer의 T_m 값과 증폭 길이 및 염색체의 위치 등을 고려하여 마커들을 선별하였으며, 각 마커에 대한 표준 allele ladder를 제작하며, 이형접합도, PIC 및 PD를 계산하였다.

나. SSR haplotype ID 개발

변별력이 탁월하고 (품)종간 유전형이 서로 다른 SSR 10좌위 정도를 선별하여 이들의 동시증폭 시스템 확립 및 haplotype을 표기하여 개체와 개체를 정확하게 구분할 수 있는 DNA ID를 고안하였다. Haplotype ID 식별력은 동일 산삼근으로부터 유래하면서 서로 다른 계대배양의 부정근들을 이용하여 그 결과가 언제나 동일하게 되는지를 확인하거나, 원산지나 품종이 서로 다른 시료들을 대상으로 조사하였을 때는 동일 haplotype을 가지는 경우가 없음을 확인하였다.

5. 압출성형공정

산삼배양근, 홍삼분말, 백삼분말, 홍삼미세근, 백삼미세근의 압출성형에 사용된 압출성

형기는 자체 제작한 실험용 쌍축압출성형기(THK31T, Inchen Machinery Co. Korea)이며 압출성형기의 스크루 직경은 29.0 mm (1, 2차년도)와 32.00 mm (3차년도), 직경과 길이의 비(L/D ratio)는 25:1 (1, 2차년도)과 24:1 (3차년도)이며 스크루 배열은 Fig. 1, 2와 같다.

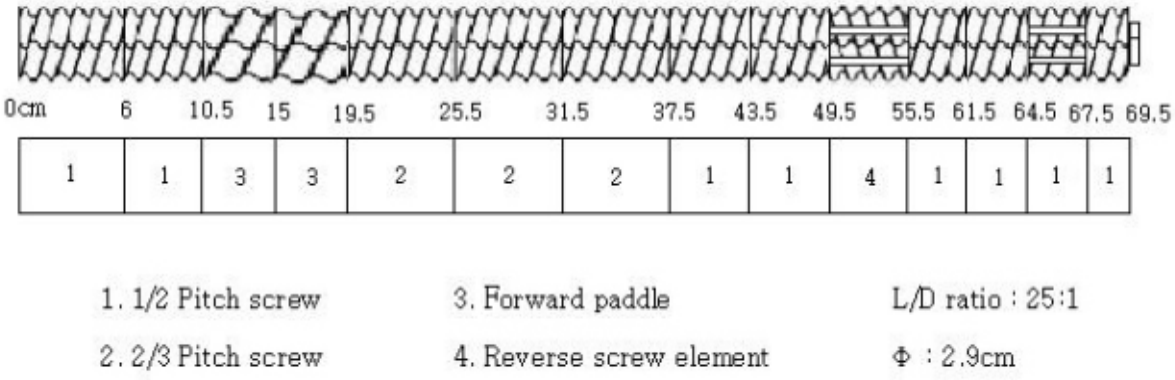


Fig. 1. Screw configuration for ginseng process(THK 31T).

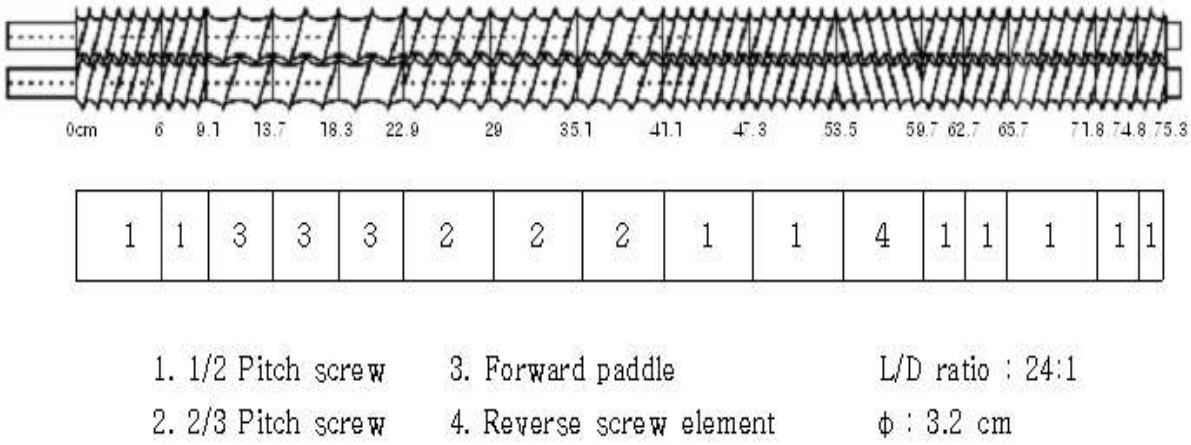


Fig. 2. Screw configuration for ginseng process(THK 31T).

압출성형 공정변수인 배럴온도는 각각 110, 120, 125, 140℃, 수분함량은 25%와 35%, 스크루 회전속도는 200 rpm, 원료 사입량은 100 g/min 로 고정하였으며, 사출구는 직경이 1.0 mm 인 구멍 3개를 열어 사용하였다.

압출성형된 시료는 50℃에서 8시간 동안 열풍건조 하였으며, 건조된 시료는 분쇄하여 35 mesh 표준체(Testing sieve, Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 통과한 분말을 4℃ 냉장고에 보관하면서 분석시료로 이용하였다.

6. 주요 성분의 정량분석

가. 총 아미노산

총 아미노산 함량을 측정하기 위하여 Ninhydrin 방법(Doi et al., 1981)을 사용하였다. 시료 용액 0.2 mL에 ninhydrin 시약 0.4 mL를 가하여 20분간 가열하여 반응시켰다. 반응액을 급속냉각 시킨 후 acetone, 0.1 M-Na_3PO_4, 증류수를 4:2:4 비율로 혼합한 희석제를 1 mL 가하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 leucine을 사용하여 작성하였다.

나. 조사포닌

조사포닌(crude saponin)함량은 Namba 등(1974)과 Ando 등(1971)의 수포화 부탄올 추출법에 준하여 측정하였다. 시료 5 g에 수포화부탄올 50 mL을 가하여 80℃에서 1시간 환류냉각추출 한 후 Whatman No.41 여과지로 여과하고, 다시 잔유물에 수포화부탄올 50 mL를 가하는 조작을 2회 반복하여 추출액을 만들었다. 추출액에 증류수 50 mL를 가하여 분액여두에서 방치시킨 후 상층액과 하층액이 완전히 분리가 되면 상층액만 회수하여 감압농축 후 농축물에 에틸에테르 50 mL를 가하여 36℃에서 30분 동안 환류냉각추출을 하였다. 에틸에테르 추출액을 감압농축하고 105℃에서 2시간 동안 건조시킨 후 조사포닌 함량을 측정하였다.

다. 말톨

말톨(maltol)성분 분석은 시료 5 g를 둥근 플라스크에 넣고 80% methanol 용액 100 mL을 가하여 70℃에서 1시간 환류냉각 추출하였다. 추출액을 여과한 잔류물에 80% methanol 용액 100 mL을 가하여 다시 1시간 환류추출 후 여과한 1차 추출액과 2차 추출액의 여액을 모아 감압농축하였다. 농축물을 증류수 50 mL에 용해시켜 분액 깔때기에 넣고 ethyl acetate 50 mL을 가하여 혼합한 후 상층액과 하층액이 완전히 분리될 때까지 정치시켰다. 상층액을 농축하여 methanol 1 mL에 용해시켜 검액으로 하고, 말톨 표준품 5 mg을 methanol 1 mL에 용해시켜 표준용액으로 하였다. 검액 및 표준액 각 10 μL씩을 TLC용 실리카겔 판에 점적한 후 benzene, acetone(4:1, v/v)을 전개용매로 하여 약 10 cm 전개한 후 박층판을 풍건하였다. 염화제2철($FeCl_3$)시액을 고르게 뿌려 발색시킨 다음 110℃에서 5분간 가열하여 말톨을 확인하였다(Ha and Ryu, 2005).

라. 산성다당체

산성다당체(acidic polysaccharide)는 carbazole-sulfuric acid 방법(Do et al., 1993)을 사용하여 측정하였다. 고려인삼의 산성다당체는 주로 galacturonic acid의 polymer로서 분자구조상 pectin과 유사한 물질이므로 pectin 정량에 사용되는 carbazole-sulfuric acid 방법으로 측정하였으며 blank에는 carbazole 대신에 에탄올을 사용하였다.

각 인삼분말을 물에 1:4 (w/v) 비율로 혼합한 뒤 9,000 rpm에서 10분간 원심분리(Hanil Industrial Co., Korea)하였다. 이로부터 상등액을 취해 여과(Whatman No.6)하여 수용성 추출물을 조제하여 polyphenolic compound 함량 분석용 시료액으로 사용하였다. Folin-Ciocalteu method를 수정하여 시료에 있는 total polyphenolic compound 함량을 구하였다. 추출물 5 mL에 0.2 N Folin-ciocalteu's phenol reagent와 Na_2CO_3 포화용액(75 g/L)을 5 mL씩 넣어 60분간 실온에서 반응시킨 후 분광광도계(HP8452, Hewlett Packard, USA)를 사용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. gallic acid standard calibration curve를 이용해 total polyphenolic compound의 함량을 구하였다.

마. 일반 성분

인삼분말의 일반성분분석은 AOAC법(1985)에 따라 수분은 105℃ 상압가열건조법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조단백질은 semi micro Kjeldahl법, 조회분은 600℃ 직접회화법으로 정량하였다.

7. 갈색도와 적색도

갈색도와 적색도는 Chang과 Chang(2001)의 방법을 수정하여 측정하였다. 시료 5 g을 70% 에탄올 30 mL를 가하여 80℃에서 1시간 추출한 후 원심분리기를 사용하여 5,000×g에서 10분간 원심분리한 상층액을 분광광도계(Libra S35, Biochrom Co., England)를 사용하여 420 nm(갈색도)와 520 nm(적색도)에서 측정한 흡광도를 비교하였다.

8. 침출특성 및 침출속도상수

홍삼, 산삼배양근과 압출성형 산삼배양근의 침출속도는 건조분말 1 g 을 티백에 담아 증류수 200 mL과 같이 넣은 후 침출시험조(TW-SM, Wooju Scientific Co., Korea)를 사용하여 온도는 50℃, 임펠러 회전속도는 100 rpm 으로 고정시켜 실험하였다.

침출시간 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 50 분마다 침출용액을 3 mL씩 채취하여 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액을 420 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 갈색도로 나타내었다(Kim and Ryu, 2005). 갈색도(파장 420 nm)는 사포닌을 비롯한 인삼유효성분 지표가 될 수 있으므로 침출시간에 따른 흡광도를 이용하여 갈색 반응속도상수를 침출속도상수(k)로 사용하였으며 침출속도 상수는 초기 7분 동안의 갈색도의 변화량에 다음의 식을 이용하여 계산하였다(Esteve et al., 1999).

$$\frac{dA}{dt} = kA \qquad (1)$$

용출시간이 t_0에서 t에 도달하는 동안에 백삼, 홍삼, 산삼배양근, 압출 성형산삼배양근의 흡광도(용출량)는 A_0에서 A_t로 증가하는 조건으로 변수를 분리하여 적분하여 식(4)을 구하

였다.

$$\frac{dA}{A} = kdt \qquad (2)$$

$$\int_{A_0}^{A_t} \frac{1}{A} dA = k \int_0^t dt \qquad (3)$$

$$ln \frac{A}{A_0} = kt \qquad (4)$$

A: Absorbance of solution at released time(t)

A_0: Absorbance of initial released time(t_0)

k: Release rate constant(min^{-1})

t: Released time(min)

9. 인삼의 분말의 발효조건 확립

가. 발효액의 제조

인삼 시료분말 10 g에 증류수를 50 mL씩을 가하여 혼합한 후 각각의 혼합액에 누룩 0.13 g와 효모 0.05 g를 접종하여 각각 시료를 만들었다. 발효조건은 27℃에서 정치배양을 하였으며, 15일간 발효하였다. 시료의 채취는 발효시작 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15일에 한 개씩 채취하였으며, 발효시간에 따른 발효액은 원심분리기(Mega 21R, Hanil Science Industrial Co., Inchon, Korea)에서 7,121×g로 20분간 원심분리하여 상층액을 분석시료로 사용하고 4℃에서 보관하였다.

나. pH 및 산도

발효액의 pH는 Microprocessor pH Meter(pH 213, Hanna instruments, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 발효액의 산도는 식품공전(2002)의 조미식품 식초 시험방법에 준하여 측정하였다. 10% 발효액 25 mL에 1% phenolphthalein alcohol 0.5 mL을 가한 후 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 엷은 홍색이 30초 유지되는 시점에서의 소비량을 측정하여 acetic acid percentage(%)로 환산하였다.

다. 당도

발효액의 당도는 아날로그 당도계(Hand Refractometer, ATAGO N1, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

라. 총당

발효액의 총당 함량은 Phenol-H_2SO_4법(Dubois et al., 1956)으로 정량하였다. 1% 발효액 1 mL에 5% 페놀수용액 1 mL를 가한 다음 진한 황산(98%, v/v) 5 mL를 가하여 혼합하고 15분간 상온에서 방치하여 반응시킨 후 분광광도계(Libra S35, Biochrom Co., Cambridge, England)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선을 이용해 정량하였다. 총당 함량의 검량곡선은 글루코오스를 이용하여 작성하였다.

마. 환원당

발효액의 환원당 함량은 DNS법(Miller, 1959)으로 정량하였다. 2% 발효액 1 mL에 DNS 시약 3 mL를 혼합하여 끓는 물에서 5분간 반응시키고, 얼음물에서 15분간 급속 냉각하였다. 냉각된 반응액에 증류수를 가하여 25 mL로 정용한 후 분광광도계(Libra S35, Biochrom Co., Cambridge, England)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선을 이용하여 정량하였다. 환원당 함량의 검량곡선은 글루코오스를 이용하여 작성하였다.

바. 알코올 함량

발효액의 알코올 함량은 국세청기술연구소 주류분석규정(2007)에 의한 주정분 분석법과 산화 · 환원법(Chae 등, 2004)을 응용하여 측정하였다. 발효액 1 mL과 $CaCO_3$ 1 g, 증류수 200 mL를 혼합한 후 가열증류를 하였다. 증류액이 70~80 mL 정도 채워진 후 증류수를 이용해 100 mL로 정용하였다. 증류액 1 mL에 0.2 N 중크롬산칼륨용액 2 mL와 진한 황산 (98%, v/v) 1 mL를 혼합 후 냉암소에서 1시간동안 반응 시킨 후 분광광도계를 이용하여 590 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 알코올 함량의 검량곡선은 에틸알코올을 이용하여 작성하였다.

10. 인삼 추출물의 성분 및 특성분석

가. 추출용매

추출조건에 따른 인삼 추출물의 항균활성을 측정하기 위하여 증류수와 60, 95%의 에탄올을 사용하여 추출하였으며, 용매 200 mL과 시료 25 g을 혼합한 뒤 8시간 동안 35℃의 항온수조(Buchi Heating Bath B-490, Switzerland)에서 110 rpm으로 교반시켜 주었다. 인삼추출물은 Buchner 깔때기를 이용하여 여과지(Whatman No.1)를 사용하여 여과하고 용매는 감압 하에서 회전식 농축기(Buchi R-200, Labortechnik, Flawil, Switzerland)를 이용하여 40℃ (물 추출물은 50℃)로 제거하였다.

나. 총페놀성 화합물

인삼 추출물의 총페놀성 화합물의 함량은 Folin-Ciocalteu 비색법(AOAC, 2005)에 의하여 측정하였으며, gallic acid를 표준물질로 사용하였다. 0.5 mL의 추출물에 6.5 mL의 증

류수, 0.5 mL의 Folin -Ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 3분간 반응시킨 후 1 mL의 Na_2CO_3과 증류수 1.5 mL을 첨가하여 암소에서 1시간 동안 반응시켜 UV/Vis-spectrophotometer를 사용하여 725 nm에서 흡광도 값을 측정 하였으며 Gallic acid를 이용하여 작성한 검량선을 통해 페놀성 화합물을 계산하였다.

다. DPPH에 의한 전자공여능

추출물들의 전자공여능 또는 라디칼 제거능은 DPPH (2,2-diphenyl-1- picryhydrazyl radical)를 사용하여 Brand-Williams 등(1995)의 방법을 이용하였다. 인삼분말을 60% ethanol로 추출하여 시료액으로 사용하였다. 20 mg/ml의 농축액 100 μl에 증류수 5 ml을 가한 후 0.1 mM DPPH를 첨가하여 30분간 상온에서 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH에 의한 radical-scavenging activity는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Scavenging activity}(\%) = [(Abs_{blank} - Abs_{sample})/Abs_{blank}] \times 100$$

라. 환원력 측정

환원력 측정은 Yildirim 등(2001)의 방법에 따라 측정하였다. 농도를 달리한 농축액(5-20 mg/ml) 1 ml에 인산 완충액(0.2 M, pH 6.6) 2.5 ml 및 1% potassium ferricyanide 2.5 mL을 가하여 50℃ 수욕상에서 30분간 반응시켰다. 여기에 10% trichloroacetic acid 2.5 mL가하여 3000 rpm으로 10분간 원심분리시켰다. 상등액 2.5 mL을 취하여 증류수 2.5 mL과 0.1% ferric chloride 0.5 mL을 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 항균성 측정

항균활성은 한국생물자원센터에서 분양받은 세균(*Bacillus subtillis* (KCTC1023), *Listeria monocytogenes* (KCTC3710), *Staphylococcus epidermidis* (KCTC3958), *Escherichia coli* (KCTC1041), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC1636), and *Salmonella Typhimurium* (KCTC1925)을 사용하여 NCCLS(2001)법으로 측정하였다.

Nutrient broth를 이용하여 37°C incubator에서 24 시간 배양한 콜로니를 백금선을 이용하여 채취하여 30 mL의 액체배지에 접종 후 37℃ 항온수조에서 24시간 동안 110 rpm으로 배양하였다. 배양액 1 mL를 무균의 염용액(0.85% NaCl) 20 mL에 접종하여 표준물질인 McFarland No. 0.5와 혼탁도를 비교였다. 배양액은 Mueller Hinton Agar 배지에 0.1 mL을 도말하고, 각각의 농축액은 500 mg/mL로 희석하여 paper disc (6 mm in diameter)에 흡수시켰다. 37°C incubator에서 24 시간 배양 후 disc 주변에 생성된 clear zone의 직경(mm)을 측정하여 항균성을 평가하였다.

바. 통계분석

항균활성 실험의 결과는 방법 ± S.D.로 표현되었다. 분산 분석은 ANOVA 절차에 의해 실행되었으며 상호 관계 계수 (r)는 2개의 가변을 결정하는 이용되었다. SPSS 방법을 이용한 결과는 $P<0.05$ 수준일 때 유의성을 가지며 $P<0.01$을 가진 결과는 통계적으로 중요한 유의성을 가진다.

제 2 절 인삼류의 DNA 지문 개발 결과

1. Microsatellite-enriched genomic DNA library의 제작

인삼(*Panax ginseng*)의 유전체로부터 다양하면서 많은 수의 SSR 마커를 분리하기 위해서 microsatellite(SSR) enriched gDNA library를 제작하였다(Fischer and Bachmann, 1998; Hamilton et al., 1999). 인삼조직을 액체 질소를 이용하여 파쇄한 후, plant genomic DNA purification kit를 이용하여 총 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA를 *Sau*3AI 제한효소로 처리한 후, 전기영동하여 0.2-1.2kb의 단편만을 아가로스 겔로부터 추출하였다. 이어 단편의 양 끝에 *Sau*3AI 제한효소 인식서열(-GATC-)과 상보적인 결합을 유도할 수 있는 adaptor를 oligo A와 oligo B의 annealing의 통해 준비하한 후 각 절편에 부착하였다.

Adaptor	Oligo A 5-GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG Oligo B 3-CCG GTC TCT GGG GTT CGA AGC CTA G- PO4 [*Sau*3A1 restriction site]

12 종류 SSR의 biotinylated-oligomer의 혼성화를 유도한 후, 마그네틱 bead를 통해 SSR motif를 포함하고 있는 다양한 DNA 절편을 선별하였다(Table 1). SSR enriched DNA 절편은 pGEM-T Easy cloning vector (Promega, USA)에 삽입한 후, Gene Pulser Xcell (Bio-RAD)를 이용하여 *E. coli*(DH10B)에 형질전환하였다(Fig. 3A).

제작된 library의 대략적 독립 균주 수는 약 2 X 10^5 cfu로 계산되었으며, 분리한 플라스미드를 *Eco*RI 제한효소로 절단하였을 때 insert 검출 비율은 대략 91%였으며, insert 크기는 대체로 0.2-1.2kb 범위에 있었다(Fig. 3B). 이와 같은 결과는 라이브러리가 성공적으로 제작되었으며, 향후의 실험에 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

Table 1. Biotin-oligonucleotides for the microsatellite-enriched gDNA library.

Repeat unit	Oligomer sequences (5'-biotin → 3')
Di-nt repeats	$(AT)_{15}$, $(AC)_{15}$, $(AG)_{15}$
Tri-nt repeats	$(ACC)_{10}$, $(TAA)_{10}$, $(CAA)_{10}$, $(GAA)_{10}$, $(ACG)_{10}$
Tetra-nt repeats	$(AAAG)_{7}$, $(AGAT)_{7}$, $(AAAT)_{7}$, $(ACAT)_{7}$

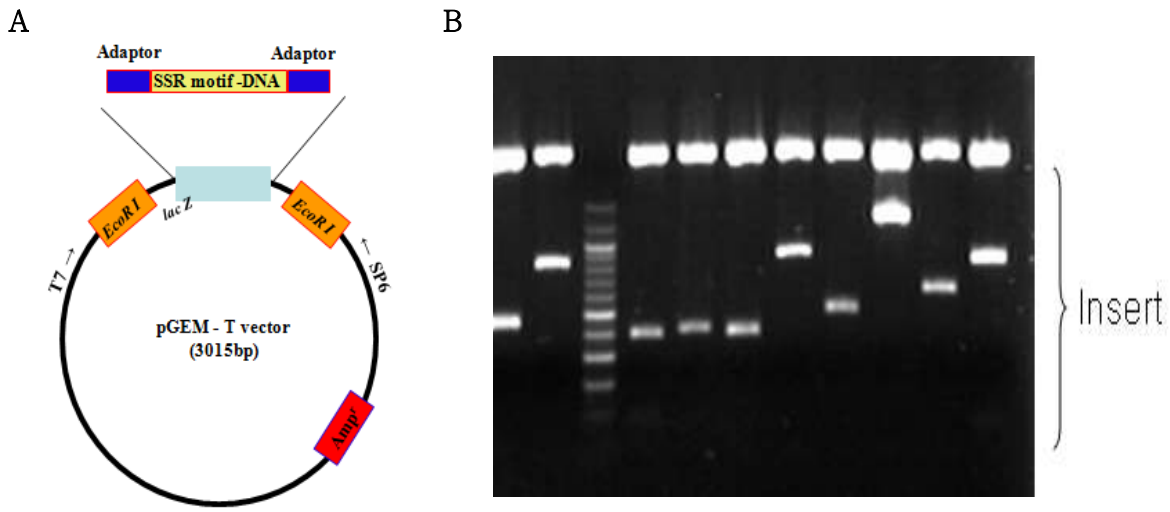


Fig. 3. Cloning of SSR enriched DNA fragment. (A) Insertion of DNA fragment into pGEM-T Easy vector, (B) Digestion of plasmid with *Eco*RI restriction enzyme.

2. 다형성 및 종간 특이성을 보이는 SSR marker의 선별

가. Library 스크린

SSR library의 *E. coli*를 X-GAL이 포함된 한천배지에 도말하여 배양한 후, white 콜로니 2,780개를 임의 선정하여 플라스미드 DNA를 추출하고 *Eco*R I 제한효소를 처리하여 insert를 확인한 결과 2550개(91.7%)의 플라스미드에서 insert가 확인되었다. 각 클론으로부터 분리한 2,550개 플라스미드를 universal primer (T7, SP6)를 이용하여 염기서열을 분석하여 SSR motif가 존재하는지를 검사하였다.

위의 과정을 통해 분석된 염기서열 중 SSR motif를 갖는 842개(33.0 %: 842/2,550)의 서열을 얻었다. 842개의 염기서열을 각각 정렬 중복 분석(alignment analysis)과 유사성을 검사한 결과 39.8%에 해당하는 251개의 서로 다른 SSR motifs를 분리하였다(Table 2). 이것은 반복서열의 높은 중복을 보인 것으로, 그 이유는 클로닝 단계에서 클론의 중복이 있

었거나, 상당히 높은 비율로 존재할 것으로 예상되는 multi-loci의 존재 때문일 것으로 생각된다 (Hong et al, 2003). 중복 되지 않는 251개의 SSR 염기서열은 2염기 반복 89회 (35.5%), 3염기 반복 117회 (46.6%), 4염기 반복 20회 (8.0%), 5염기 이상 반복 5회 (2.0%)로 관찰되었고, (AC)n(AT)m, (ATG)n(CTGATG)m과 같은 복합 반복 구조도 20회 (8.0%)로 관찰되었다. Fig. 4는 몇가지 유형의 반복 서열을 보이는 크로마토그램이며, Table 3은 library 스크린을 통해 얻은 SSR motif의 반복 단위별 출현 빈도를 보여준다.

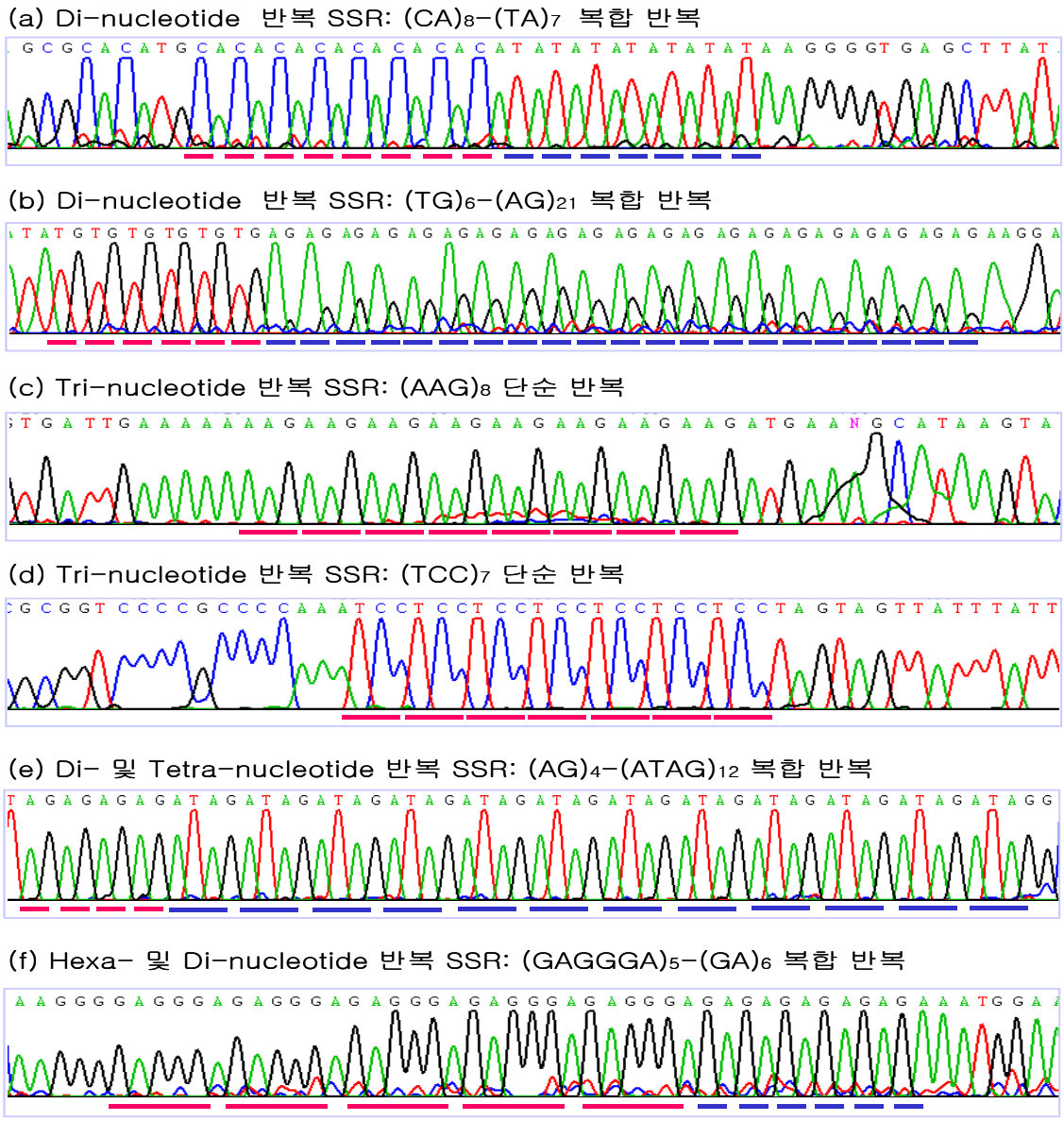


Fig. 4. Sequencing chromatograms having SSR motifs.

Table 2. Summary of the *P.ginseng* microsatellite-enriched genomic library screen.

Screening step	No. of colonies	Remarks
Library construction	2 x 10^5 cfu	Independent cfu
Plasmid purification from white colonies	2,780	Random selection
Insert isolation (*Eco*R I digestion)	2,550	Insert detection: 91.7 %
Plasmid sequencing	2,550	100%
Identification of microsatellite motifs	842	SSR ratio: 33.0 %
Non-overlapping SSR motifs	251	

Table 3. Numbers of identified microsatellite markers according to repeat sequences.

Repeat unit	Repeat sequence	Synonym[a]	Observed No.	Total
Di-nt	AT	TA	11	89
	AC	CA, TG, GT	20	
	AG	GA, TC, CT	58	
Tri-nt	AAT	ATT, TTA, ATA, TAA, TAT	8	117
	AAC	ACA, CAA, TTG, TGT, GTT	56	
	AAG	AGA, GAA, TTC, TCT, CTT	25	
	ACC	CCA, CAC, TGG, GGT, GTG	18	
	ATG	TGA, GAT, ACT, CTA, TAC	2	
	AGG	GGA, GAG, TCC, CCT, CTC	3	
	Others	*ACT, ATC, GCT, CGG, CGA*	5	
Tetra-nt	AAAT	AATA, ATAA, TAAA, ATTT, TTTA, TTAT	3	20
	AAAC	AACA, ACAA, CAAA, TTTG, TTGT, GTTT	3	
	AAAG	AAGA, AGAA, GAAA, TTTC, TTCT, CTTT	5	
	AGAT	TAGA, AGAT, GATA, ATCT, TCTA, TATC	2	
	ACAT	TACA, ACAT, CATA, ATGT, TGTA, GTAT	5	
	Others	*AATG, AATT*	2	
Penta-nt	GCCAA	TTGGC	1	1
Hexa/hepta-nt		*AAATGG, AAATCCC, CTCCTTT, TTTGTTG*	4	4
Complex repeat		-	20	20
Total				251

[a]Repeat sequences as same as the sequence in the left column.

나. SSR 특이적인 primer의 제작 및 유전자형의 분석

SSR-enriched library 스크린으로 분리된 251개의 독특한 SSR 서열을 바탕으로 각 마커 특이적 primer 200 쌍을 Primer3 프로그램을 이용하여 제작하여 PCR 증폭을 실시하였다(Table 4).

제작된 primer는 20-26bp 내외의 길이로 제작되었으며, 각각의 primer의 Tm 값 (56℃ 이상)을 고려하여 PCR 조건을 확립하고 각각 증폭을 실시한 결과, 94.3%에서 성공적으로 증폭되었다. Table 4는 일부 마커의 primer 서열 및 annealing 온도를 보여준다. 증폭된 산물은 1차적으로 5% denatured polyacrylamide gel 전기영동과 silver staining법으로 유전자형을 분석함으로써 다형성의 유무를 확인하였다.

Table 4. List of SSR-specific primers in *P. ginseng.*

Marker	Primer (5' → 3')		SSR motif	Tm(℃)
PG2	F	GCAGTGGCAGAAGTTATCTGGG	(AAC)n	60°C
	R	CCCTCCTTGATAACTTTCTGAC		
PG6	F	TTCAAGCTAAAGACATCTTAGC	(AAC)n	60°C
	R	AGTCCCTTAGGACAAGGACCCC		
PG22	F	CTGTCTATGCAAGTTGCGGCTG	(AG)n	58°C
	R	ATCAAGTTGGAAATCAGGTGGG		
PG24	F	CATATGTATAGCACGAGGACGTG	(AAAG)n	60°C
	R	CGTTACGTGTTTGATGCAGCAATGG		
PG27	F	CGCCAAGCTGCTAAGTATAGAAG	(AACA)n	60°C
	R	GATTCCTTCAAGGCTAGTAGCC		
PG29	F	AATCAGAAACAAAGAAAGCTAAAAC	(ATG)n	60°C
	R	CTCTCTCATCTCTCTCTCTTCC		
PG41	F	TATGGAGGAAGCAGTAGTGGGG	(AAC)n	58°C
	R	CCTTCTTCTTAAACTCTCCACG		
PG49	F	TATGGAAGACCACACCTGCA	(AG)n	62°C
	R	GTAAACTAGCAGTAAGGGGCTC		
PG67	F	CACCCCAATTTTTTCCCCTTGC	(ACAT)n	60°C
	R	GAAGAACTGAATTAAAAAGCCTAAC		
PG96	F	GATTTCCACCTCCCACATTCGC	(ACC)n	60°C
	R	GAGGAAGAGATGAGTGACGGTG		
PG105	F	GAAACTCGTGGAGGGAATAGCAG	(AAC)n	60°C
	R	CCCTCCTTGATAACTTTCTGACTGG		
PG106	F	ATCATTAGAACGTGTAAAGACG	(AAAG)n	58°C
	R	ATCTAGCTAGTGGGACCTAGCT		
PG122	F	TGCTTCCAAGTAGGCAGATGCG	(AGAGGG)n(AG)n	62°C
	R	CCTTGACTCGAATTCCCTTCGC		
PG169	F	GAGCAAAAAGCCCTCGTGATTG	(AAG)n	60°C
	R	TAAACAATCACCAATATTAAGGGTCC		
PG178	F	GAAGTACGTACACCAGGGAGGC	(TG)n(AG)n	60°C
	R	GTTCTTTAACTTGGCATTTACC		

Marker	Primer (5' → 3')		SSR motif	Tm(℃)
PG179	F	GTGTTAGAGAAGGCCATACTCGC	(AAG)n	60°C
	R	ATTGCTACTCCCACCAGTCTTG		
PG190	F	GTTTAACATGTGTATTCTTTGCC	(AG)n	60°C
	R	GTATACCTATTTTGAGGGCGTC		
PG192	F	CCTGCTGGTTTCCAGAACCTAC	(ACC)n	60°C
	R	ATGTGGAGGCAAGGCTGTGACC		
PG194	F	CCAGGATAATGTGATGTCAGGCG	(AAG)n	60°C
	R	AATACCTCTAATAAATTCTCCTCTGG		
PG196	F	GATTCCAGTTCCACATTGCAGTC	(ACC)n	58°C
	R	CAAACACAACCCAGAGCAGAGG		
PG209	F	CGCTGAAGGTGGAAGCGATGCGG	(AAG)n	60°C
	R	TCCTGTGCCACTTCCACTAGCC		
PG216	F	CCCATTCGTATTCCACTTCCTC	(ACC)n	60°C
	R	GTTGAAAGTGGAGGCGAGGCAG		
PG220	F	CCTAATAGAATCTAAGTATTTAACC	(ACC)n	–
	R	TGGCCCAGTCATCATACCAACC		
PG241	F	CTCTTTCCCCCCACCCAATCTCTC	(AC)n	60°C
	R	GAGGGGAAGATTGTGATGGTTGC		
PG248	F	AGTTGGCATCGGTTTTATGACT	(AAC)n	58°C
	R	GGGCTTTTTGCTTATTAATTGG		
PG252	F	CTTCCCACTCATTACCACACGGG	(ACC)n	60°C
	R	GCATAATTTGGCCCGGTGGATG		
PG255	F	GAAGATGTTCAGAGCATGAAGAC	(AAC)n	58°C
	R	TGGCCCTGCTTCATTTAGTCCC		
PG275	F	TCAACTGCCATAGCCAAGGGTGCG	(ACC)n	56°C
	R	CTCATAACTAATGGAAATGGAG		
PG281	F	ATTTACAACTCTCTTCTTCCTCTAC	(ATAG)n	60°C
	R	GTAGTAGTAGTAAAACTTTGCTAACG		
PG287	F	GTGGGACTGGTATACAATAAGA	(AG)n	60°C
	R	GTGTTCTTAGTTGCCCATTTG		
PG303	F	TATAGAAATTGCAGATA	(AG)n	40°C
	R	GCGCCCTTTCCGCTTTCATCAG		
PG307	F	CATTACATACTACTCTCCCAC	(AG)n	55°C
	R	GTTGGAGATTAATGTATAGATA		
PG315	F	GGGACTATATATAGCGCGATTAC	(AAG)n	60°C
	R	GAGCCAGAAGGATCGAAGTGAC		
PG316	F	GCCCCGCCATTTTCTCGCATAC	(AG)n	60°C
	R	CTGTTCTTGGCTTGATAAGAGGC		
PG332	F	AGTCGTTAATCGCTAGGTAGGC	(AT)n(TG)n	60°C
	R	TTTGTCTCCTCTTGTTTAGCGCAC		
PG341	F	CAACAAGCTGCCAAGAATCAAGG	(ACC)n(AAC)n	58°C
	R	CCTTGGAACTCAGTTTAGTCCC		
PG355	F	TACGAACAGAGCTTACACAGC	(AAC)n	60°C
	R	CTCTTCAAGTTCAGTAGACTTGG		
PG360	F	ATCGTACATATACATAC	(ACAT)n	58°C
	R	ACTCTCATAGAGTCATAGTTGC		
PG362	F	CCAGCTCCCACATTTGCGTTCCA	(ACC)n	60°C
	R	CTGAGAGTGGAGGTGAGGCTGT		
PG363	F	CAGAGCATGAAGACATCTTAGCAGC	(AAC)n	62°C
	R	TCCACTAAGGAAGGGCAGCACC		

Marker	Primer (5' → 3')		SSR motif	Tm(℃)
PG374	F	AATATCAACTATGCAATTTGAC	(ACC)n	60°C
	R	CTTGTCCTTTTCAAGGACTGATCG		
PG409	F	GATCAATCAGAAACAAAGAAAGCT	(ATG)n	58°C
	R	GCTGCTCTTTCTGGGTATGCTT		
PG419	F	CACACAGTTGCATCATAACGCC	(ACC)n	60°C
	R	GCTGAAATGAGAGATACCCCGCC		
PG444	F	TACCACATGAAGCTGCTAAGTAC	(AAC)n	60°C
	R	CTCTTCAAGCCCAGTAGGCTTGG		
PG450	F	GATCTTCTGGATGATTTCGACAT	(AG)n	58°C
	R	TTGCCCACCCCTTTCTCCACC		
PG454	F	ACCAGCGCACCACAGTTTATCC	(AAC)n	60°C
	R	TCTGATTTCTTTTCTTGCTGAGG		
PG465	F	CATTTAAATACAAACCCCCTTCTTC	(AACAAAC)n	60°C
	R	TTGGGTGTAATGTAATATAGCTCTG		
PG467	F	GGGATTAGGAGGTTTATTTGGT	(AAG)n	58°C
	R	ACCTCCTCTTCTCCTCTCCCTC		
PG471	F	GAGAAGTGGAATACGACTGAGC	(AG)n	58°C
	R	GTACTTGTAGCTTCCCTCTCTC		
PG493	F	AAGTACAGAAGATGTTCAGAGC	(AAAC)n	60°C
	R	CCGGATAAAGACCCCTCAGGCC		
PG509	F	GGATATTGGGCATGGATCGAG	(AT)n	60°C
	R	CCTATATGCACATGTATATTGGTC		
PG525	F	GCAACATACAACAGCAACAACC	(AAC)n	60°C
	R	CCCTTGGTCATATGATGTACAGG		
PG527	F	GAAGTTGGCTAGCTTGGGAGCA	(AAG)n	60°C
	R	GCACATCTCATTCTTCCAACATC		
PG555	F	GTGTAGTTCACATACCAGTCCAC	(AAC)n	60°C
	R	GACCAACTCTAACAACCCCATG		
PG557	F	CCAGCCAAATGAGGTGTACTTTG	(AAAT)n	60°C
	R	CGGAGTATCTTTCTTCTTTCTCCTC		
PG578	F	GCAACTCCAGGCATAGAAAAATAC	(AG)n	60°C
	R	CACACCAACGGCACTTCAGC		
PG582	F	AATATTAAAATCTTTACCATTC	(ACT)n(AGG)n	58°C
	R	TACTCCAATACCACTATTCTCC		
PG584	F	GCAAACGAGGCCTCGCACTACTTC	(AC)n	-
	R	GGTACCCCCGACATCCGTGTTAC		
PG607	F	CCCAAGCTTCGGATCGTGATAAC	(AG)n	58°C
	R	GATGGAACGTATCTATGTACAG		
PG615	F	CGAATGGGTTACAAAGAACCTGGG	(AATG)n	60°C
	R	TATGGAAGTGTCTGCCAAGGTC		
PG620	F	AGGTGAAAACGAGGCCTCGCAC	(AC)n	60°C
	R	ACATCCGTGTTGCCACGGTGAC		
PG628	F	CAGAATTACTGTGGAGGAGGAG	(AAG)n	62°C
	R	AGCAAAAGCACAAGCCACAGCC		
PG639	F	GTTATCTGGGAAAGAGGAAATGG	(AC)n	60°C
	R	CTTTTCTTAAACCCTCCTTGATAA		
PG656	F	ATGAGAAGAGTGAGTAGATGATTA	(AAGA)n	62°C
	R	TCTCTCATATCATCAATAACATCA		
PG668-1	F	TTACATTCTATCAGTCAGCTTCAC	(AG)n	56°C
	R	GTTCTTTTCACGATTCGGTCCG		
PG668	F	CTGGCATCGAAGTTTCTCCATTC	(AGG)n	60°C
	R	TGCATAGCACAGAGAGGAGG		
PG709	F	GTGGCGGGAAGAAGACATT	(AG)n	60°C
	R	TAGGCAGGTCCATCTCTCG		
PG744	F	AATCTTTTACCATCCGCCGCGC	(ACC)n	58°C
	R	GCAAGAATGCGGTGGTGGAAAG		

Marker	Primer (5' → 3')		SSR motif	Tm(℃)
PG752	F	AAGCAATACTCGCTGAAGGTGG	(AAG)n	60°C
	R	TCCACCACTACCACCTCCATTC		
PG764	F	GGCAGCGGACGACGAATGAGGG	(AG)n	54°C
	R	TAGGGATTTAGTATGCAATTAG		
PG770	F	CCTCTTTGGGGCAGGGATATTTG	(ATC)n	60°C
	R	CCAGCAAACCCAAACCCTCCTC		
PG771	F	GCTTTCCGAATTAATGGTGAGGGC	(AAC)n	60°C
	R	CAAGTTCCTATGCCAGTCAAGG		
PG772	F	AGTAGATGATGGAGAGGTGGTC	(AAG)n	58°C
	R	CTAGTTGGAAATTCTTCTCCAA		
PG773	F	GTGGAGGGAGTAGTAGTGGTGG	(AAC)n	60°C
	R	AACCCTCCTTGATAACCCTCTG		
PG776	F	AAGAGATCGGTGGGCTTTTCCC	(ACAT)n	62°C
	R	CTTTTAATAGGCTTGGAGCAAA		
PG785	F	GTGATAACATTCAATAAGAAAGTG	(AG)n	58°C
	R	GATGGAACGTATCTATGTACAGTC		
PG798	F	CATGTGAATGTATGTGAACGATTG	(AG)n	–
	R	GCTTGAAAGTGATCACTTTTCC		
PG812	F	GCACGGAGTATGGTTGTCTG	(AG)n	60°C
	R	ACAAGTACAGTTTGGAAACGTG		
PG815	F	CAGTTCCCACATTTGCAGTCCAC	(ACC)n	58°C
	R	ATCGCTGAGAGTAGAGGCGAGGC		
PG820	F	GCCTTACAGCCTCAATTTGCTGGC	(ACC)n	58°C
	R	GGGCATCTAATAAAACTCTAT		
PG824	F	CGAGGGACTGAGGCTGCTCTGTAC	(AG)n	58°C
	R	CGGATCCCCAAATCAGTCCAAACC		
PG836	F	TGTTAGAGAAGGCCATACTCGC	(AAT)n	60°C
	R	ATTGCTACTCCCACCAGTCTTG		
PG891	F	GTACAAGGAGCCTTATCTGTGC	(AC)n(AG)n	60°C
	R	GAAAACCTTATGCGCCACTTCC		
PG920	F	CATGTGTACACCAAGATATATTACC	(AG)n	58°C
	R	GAAGAGATTTGCAGAAGGATATTG		
PG946	F	GAATCGAAGTGTTAAGTTGAT	(AG)n	56°C
	R	CTTAAATCGATGATAACACC		
PG963	F	GGTCATCTTTGCACTACGGGCC	(AG)n	–
	R	GCCCCCTCGTTTCTCTAGCTTC		
PG967	F	GGACGAAGTTGCAGAAGGTGTGC	(ATT)n	58°C
	R	TCTACTAACCTTAACATTACAGAC		
PG991	F	AGTGGGAGGTATATTTTGAATGTAC	(AAC)n	60°C
	R	CCACTCAGCTTGTCCTTTTCAAGG		
PG1043	F	CTTAACCAGAATTAATGG	(AG)n	56°C
	R	GCCAGTGTCGCCCTCAAATTCC		
PG1045	F	GTCTCTTCGATGGAGAATCCTTCG	(AG)n	58°C
	R	CCACGGAAATAGCTCAGTGTTTAC		
PG1058	F	TGTGTGTTTAAAATCTCAGTCCCAC	(ATAC)n	58°C
	R	CATTTTAACTCGTTGCAGGCGCATC		
PG1063	F	CCGATGAACTGTTAATGAAGGC	(AG)n	58°C
	R	TCACTAGTGATGGCAGAGACCC		
PG1087	F	GAAAAGAGGACCACATCAAGCTGC	(ACC)n	58°C
	R	CAAGGGACCCCTCATTCCCTGGC		
PG1129	F	GTTGGATGAACCTGAGCAAAG	(ACC)n	58°C
	R	GAACGGGACAAGCCAACTAGG		
PG1134	F	CCATCTAATTACACAAATCC	(AT)n	58°C
	R	GCATGCATGTCTTGATTGGTCAC		

Marker	Primer (5' → 3')		SSR motif	Tm(℃)
PG1141	F	AGACATCTTAGCAGCTCAGCACC	(AAC)n	58°C
	R	GGCCAGCAGCCTTTGAACTTGTG		
PG1143	F	GACAAGGGAAAGGGCAAGGCGAC	(AAT)n	58°C
	R	TCATGTCCCAAGGTACCGTAACC		
PG1155	F	CTGTAACAAAACACAACCAAGAAC	(AAC)n	58°C
	R	CCCACATTTGCATTCCACTTCCTC		
PG1165	F	GATGAAGAAGGAGAAGGGAGATG	(AAG)n	-
	R	GGCTGCTAAAAGATGTTCATTGGTTAC		
PG1203	F	CAACAGGTCATTTTAACTTAAGTAG	(AAG)n(ACC)n	56°C
	R	ACAATTAAGCCCAAAATTCGATCTG		
PG1283	F	TCGCTGAAGGTGGAGGCGAGGCAG	(AAG)n	60°C
	R	GTTGTTATTGTTTCCACCACTACC		
PG1306	F	GTAAGGAAGAAGCTCCTTAACAG	(AAG)n	60°C
	R	CCCCAATTAACTCTATTCCTTATC		
PG1319	F	GCATGAACGGATACACCTTGAGG	(AG)n	58°C
	R	GGTATGCACCAGAAACGGACTGG		
PG1321	F	CTACTCTACTAGCCCAGACTCTG	(AAATCCC)n	58°C
	R	TGGGACGAGAGATTGAGAGTTCG		
PG1335	F	AGAGACAAAGTGAAGCACCAACGG	(AC)n	58°C
	R	AATACGTGCATTCAGGCAATCACG		
PG1336	F	GAGCCCCAAGCTTCGGATCAAGC	(AAC)n	58°C
	R	GGAACTTCATTTAGTCCCTCCGG		
PG1388	F	ACGGGTACCGGTGCAGGAGTAGG	(AGC)n	60°C
	R	ACCCACCAATGGAAACCTCACTG		
PG1419	F	CTAGCAGGCACGAGAGAGAGATG	(AG)n(AAAG)m	56°C
	R	GATACCCCAGGCAGTCTGATGAC		
PG1459	F	GTACAGAAGATGTTCAGAGC	(AAAC)n	60°C
	R	AGTCCCTCTGGACAAGGACCCCT		
PG1471	F	TCACTAGTGATTGGCCAGAGACC	(AAG)n	56°C
	R	GCAGCGAAATCTTTCATAATTGG		
PG1481	F	GGAGGTGATTGATGTAGTGGAATCC	(AAG)n	58°C
	R	GGCTCTCCTATACTCACTATTTCCC		
PG1510	F	GGTTTACTATGGAAGTCCGTGGC	(AAG)n	58°C
	R	TTTCTGGCATGAAATCTCTCCC		
PG1530	F	CGAACTTAGAGCTGAGGTTGG	(AG)n	-
	R	GCGAATTCACTAGTGATTGGCCAG		
PG1532	F	ACGACCAAATCGTCGACCAGCCCA	(AAC)n	60°C
	R	GCTAGTAAATTCACCAACTGCTG		
PG1553	F	CAAACTCGGTTCTTCACGATACC	(AAT)n	60°C
	R	CGCGTACCTGGGATTTAGACTCTG		
PG1663	F	CTACACGCTTTTTCATAGCTTACA	(CTCCTTT)n	60°C
	R	TGTCTGCATAAAAGAGTTCGAGGC		
PG1668	F	AGTCCAGGTCCGCTAACCTTAACA	(AAT)n	60°C
	R	GAAGAACAAAGGCGCAAAATGC		
PG1886	F	CCAATCAACTCAGTATGTGTCAT	(AAATGG)n	60°C
	R	GGGATATAAGTGCAATGTTAATTC		
PG1915	F	CTTCAGGAGTGATGAGTTGCTGAC	(AAC)n	58°C
	R	GGGCACAAGTCCTGAAAAGGAAG		
PG1946	F	GAAGAAGAATGAAGTGGAGGTTAAG	(ACC)n	58°C
	R	GGTCATCCTGCTGATTTCAAGCAC		
PG1974	F	GGCCCAGAGACCCCAAGCTTCGAT	(AG)n	-
	R	GATAGAGAGAGAAAAAGTTC		
PG1988	F	TTAGGGTTTGAACCCATTAGGG	(AAAT)n	60°C
	R	CACTAATGTTCATGTATAGTGT		
PG1993	F	CCATGAACCAACGTCTGACAACAT	(AAC)n	60°C
	R	AGAGACCCCAAGCTTCGGATCTA		

다. 인삼과 화기삼간 교차 적용성의 확인

인삼에서 제작된 116개의 primer에 대하여 미국 화기삼(*P. quinquefolius*)에서도 같은 조건으로 PCR 증폭을 시도한 결과 총 110개(94.8%; 110/116)의 마커에서 PCR 증폭에 성공하였다. 이렇듯 인삼과 화기삼간의 높은 유전적 종간 교차 적용성(inter-species transparency)은 인삼의 SSR marker가 인삼 속(屬)의 다른 종들간의 구분에 있어 매우 유용함을 나타낸다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서 선별된 SSR marker들로 하여금 인삼과 산삼 같은 동종(intra-species)내의 계통들 간의 비교뿐 아니라 품종간, 혹은 화기삼, 죽절삼, 전칠삼 등 이종간의 유전적 비교와 원산지 확인에도 그 활용도가 매우 높음을 확인하였다.

라. 다형성 마커의 선별 및 구조 분석

116개의 primer를 통해 증폭된 마커의 다형성을 먼저 변성 PAGE와 silver staining법을 통해 확인한 결과 인삼 내에서 다형성 band를 보이는 12 마커 (PG22, PG29, PG186, PG281, PG287, PG668, PG770, PG946, PG1319, PG1419, PG1481, PG1663)를 검출할 수 있었다(Fig. 4). 유전자형 분석의 결과로 얻어진 각 마커들의 다형성 band를 PAGE gel로부터 elution하고 2차 PCR을 수행한 후, 각각의 밴드에 대한 염기서열을 분석하여 정확한 반복구조 및 크기를 결정하였다. 각 마커별 관찰된 대립유전자의 수는 2-8개로, 일부 다형성 마커는 변이율이 높지 않았지만, 5개 이상의 마커에서는 상당히 높은 변이율을 보여 주었다.

반복 단위별로 분류하였을 때, PG22, PG287과 PG1319는 2염기 반복, PG186, PG668, PG770과 PG1481은 3염기 반복, PG281은 4염기 반복, PG1663은 7염기 반복으로 대부분의 다형성 마커에서 단순 구조의 반복 차이를 보였지만, PG29, PG946과 PG1419에서는 복합반복(PG29: $(ATG)_n(CTGATG)_m$, PG946: $(TG)_m-N_{18-24}-(AG)_n$, PG1419:$(AG)_n(AAAG)_m$)의 특성을 보였다. 대립유전자 이름은 기본적으로 반복 횟수에 따라 명명하여 Genbank에 등록 후 일련번호를 부여받았다(Table 5).

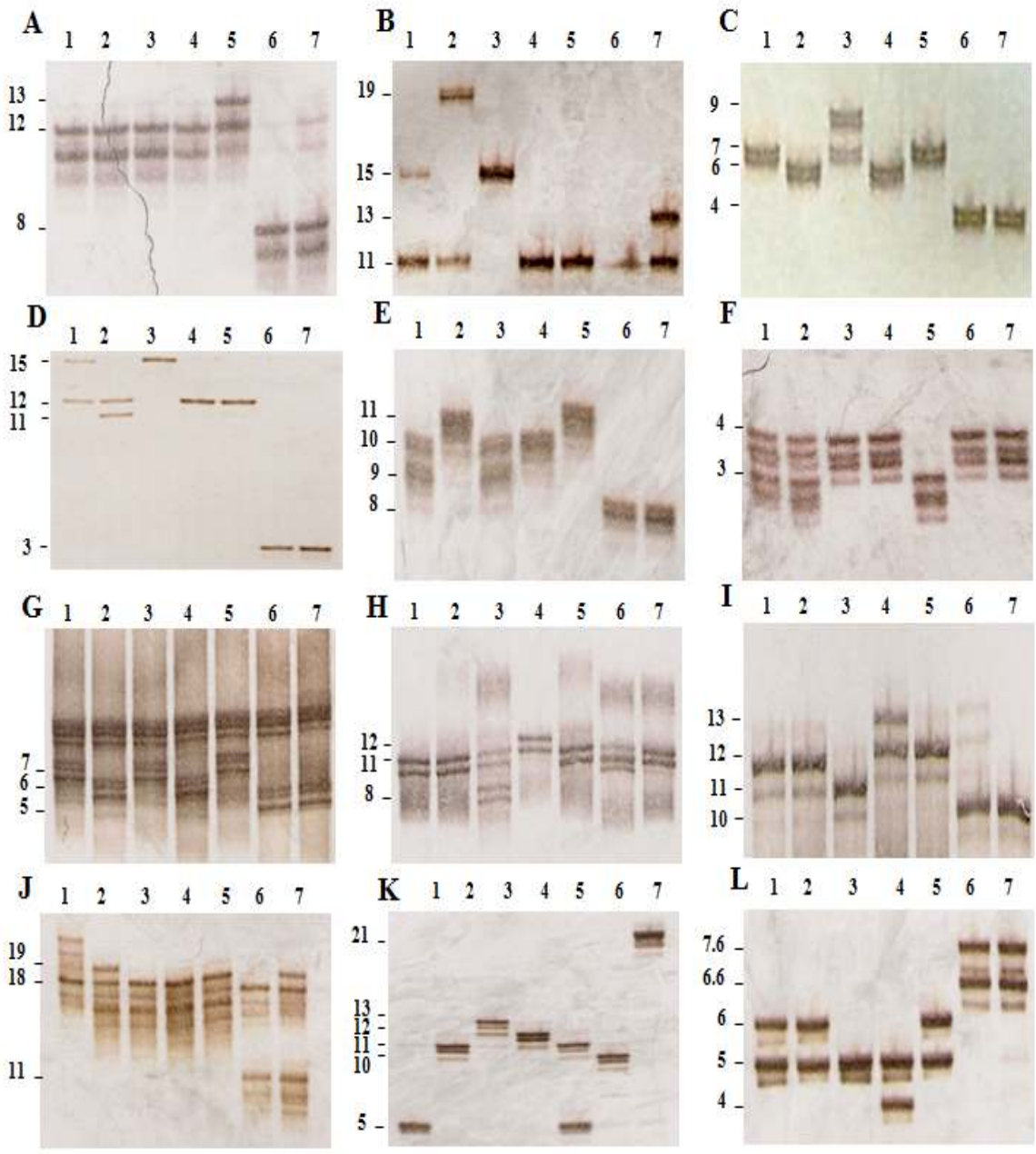


Fig. 5. Polymorphic microsatellite markers in *P. ginseng*. Each marker was amplified using a locus-specific primer pair, and the PCR products were separated in a 5% denaturing polyacrylamide gel and visualized by a silver staining method. Numbers on the left side indicate allelic names. A. PG22, B. PG29, C. PG186, D. 281, E. PG287, F. PG668, G. PG770, H. PG946, I. PG1319, J. PG1419, K. PG1481, L. PG1663. (Lane 1-5: *P. ginseng*, Lane 7,8: *P. quinquefolius*.)

Table 5. Exact allele structures of polymorphic SSR markers in *P. ginseng*

Marker	Allele(bp)	Repeat structure	Acc. No.
PG22	8[a] (101)	$P_{22}-N_{38}-(AG)_8-N_3-P_{22}$	EF140891
	12 (109)	$P_{22}-N_{38}-(AG)_{12}-N_3-P_{22}$	
	13 (111)	$P_{22}-N_{38}-(AG)_{13}-N_3-P_{22}$	
PG29	11 (113)	$P_{25}-N_5-(ATG)_7(CTGATG)_2-N_{28}-P_{22}$	EF140892
	13[a] (119)	$P_{25}-N_5-(ATG)_3(CTGATG)_4(ATG)_2-N_{28}-P_{22}$	
	19 (137)	$P_{25}-N_5-(ATG)_7(CTGATG)_6-N_{28}-P_{22}$	
PG186	4[a] (284)	$P_{22}-N_{206}-(AGG)_4-N_{21}-P_{23}$	EU401708
	6 (291)	$P_{22}-N_{206}-(AGG)_6-N_{21}-P_{23}$	
	7 (294)	$P_{22}-N_{206}-(AGG)_7-N_{21}-P_{23}$	
	9 (300)	$P_{22}-N_{206}-(AGG)_9-N_{21}-P_{23}$	
PG281	3[a,b] (126)	$P_{26}-N_{63}-(ATAG)_2-N_4-P_{25}$	EF140893
	11 (158)	$P_{26}-N_{59}-(ATAG)_{11}-N_4-P_{25}$	
	16 (178)	$P_{26}-N_{59}-(ATAG)_{16}-N_4-P_{25}$	
PG287	8[a,b] (92)	$P_{22}-N_{11}-(AG)_6-N_{26}-P_{21}$	EF140894
	9 (94)	$P_{22}-N_{11}-(AG)_9-N_{22}-P_{21}$	
	11 (98)	$P_{22}-N_{11}-(AG)_{11}-N_{22}-P_{21}$	
PG668	3 (95)	$P_{23}-N_{23}-(AGG)_3-N_{20}-P_{20}$	EF140895
	4 (98)	$P_{23}-N_{23}-(AGG)_4-N_{20}-P_{20}$	
PG770	5[a] (266)	$P_{23}-N_{82}-(ATC)_5-N_{124}-P_{22}$	EF140896
	6 (269)	$P_{23}-N_{82}-(ATC)_6-N_{124}-P_{22}$	
	7 (272)	$P_{23}-N_{82}-(ATC)_7-N_{124}-P_{22}$	
PG946	8[b] (250)	$P_{21}-N_{97}-(TG)_6-N_{18}-(AG)_5-N_{72}-P_{20}$	EF200587
	11[a] (256)	$P_{21}-N_{97}-(TG)_4-N_{24}-(AG)_7-N_{72}-P_{20}$	
	11 (256)	$P_{21}-N_{97}-(TG)_6-N_{24}-(AG)_5-N_{72}-P_{20}$	
PG1319	10[a,b] (259)	$P_{23}-N_{26}-(AG)_8-N_{171}-P_{23}$	EF140897
	11 (261)	$P_{23}-N_{26}-(AG)_{11}-N_{167}-P_{23}$	
	13 (265)	$P_{23}-N_{26}-(AG)_{13}-N_{167}-P_{23}$	
PG1419	11[a] (95)	$P_{23}-N_1-(AG)_7(AAAG)_2-N_{26}-P_{23}$	EF140898
	14 (101)	$P_{23}-N_1-(AG)_{10}(AAAG)_2-N_{26}-P_{23}$	
	19 (111)	$P_{23}-N_1-(AG)_{15}(AAAG)_2-N_{26}-P_{23}$	
PG1481	5 (103)	$P_{25}-N_{16}-(AAG)_5-N_{22}-P_{25}$	EF140899
	12 (124)	$P_{25}-N_{16}-(AAG)_{12}-N_{22}-P_{25}$	
	21[a] (151)	$P_{25}-N_{16}-(AAG)_{21}-N_{22}-P_{25}$	
PG1663	4 (171)	$P_{24}-N_{55}-(CTCCTTT)_4-N_{40}-P_{24}$	EF140900
	6 (185)	$P_{24}-N_{55}-(CTCCTTT)_6-N_{40}-P_{24}$	
	7.6[a,b] (198)	$P_{24}-N_{66}-(CCCCTTT)_5-N_{49}-P_{24}$	

[a]*P. quinquefolius* specific alleles.

[b]Same size but different structure of alleles in the same marker.

마. 인삼-화기삼 종간 특이적 마커의 선별 및 구조 분석

인삼 내에서는 다형성을 보이지 않았지만, 화기삼과는 확연히 구분되는 종간 특이성을 보이는 15개의 마커(PG49, PG307, PG465, PG525, PG557, PG578, PG628, PG656, PG772, PG785, PG1058, PG1129, PG1306, PG1335, PG1886)를 선별하였다(Fig. 6). 각각의 마커들은 염기서열 분석을 통한 구조 분석 결과, 인삼내 다형성을 보이는 마커들과는 다르게 반복구조의 차이성 뿐 아니라 비반복 부위의 서열에서도 변이를 보이기도 했다(Table 6). 이들 인삼-화기삼 특이적 마커는 인삼과 확연히 구분되는 DNA 지문으로써 원래의 형태를 알 수 없는 가공된 화기삼을 국내 인삼과 유전적으로 구분할 수 있는 유용한 마커가 될 수 있을 것이다.

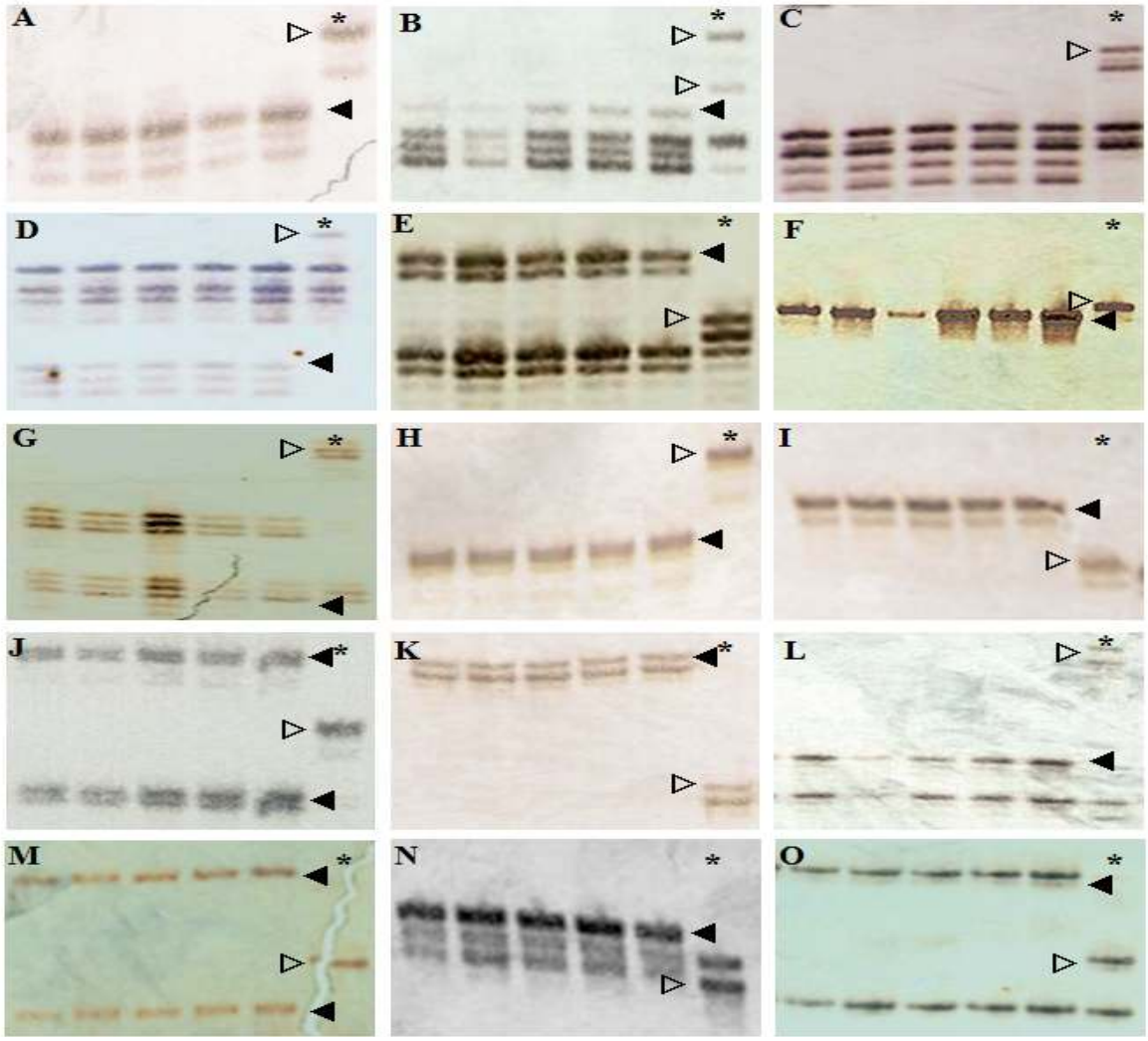


Fig. 6. Interspecific polymorphic microsatellite markers between *P. ginseng* and *P. quinquefolius*. Black (◄) and open (▷) arrow heads indicate *P. ginseng* and *P. quinquefolius*-specific alleles, respectively. The sample on the right side of each gel (indicated by *) is *P. quinquefolius*, and the other five samples are *P. ginseng*. A. PG49, B. PG307, C. PG465, D. PG525, E. PG557, F. PG578, G. PG628, H. PG656, I. PG772, J. PG785, K. PG1058, L. PG1129, M. PG1306, N. PG1335, O. PG1886.

Table 6. Interspecific polymorphic SSRs between *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

Marker	Allele(bp)	Repeat structure [b]	Acc. No.
PG49	9 (88)	$P_{20}-N_{9}-(AG)_{9}-N_{19}-P_{22}$	EF531895
	11 (92)	$P_{20}-N_{9}-(AG)_{11}-N_{19}-P_{22}$	EF531896
PG307	6 (123)	$P_{21}-N_{24}-(AG)_{6}-N_{44}-P_{22}$	EF540879
	7 (125)	$P_{21}-N_{24}-(AG)_{7}-N_{44}-P_{22}$	EF540880
	9.1[a] (130)	$P_{21}-N_{24}-(AG)_{9}-N_{45}-P_{22}$	EF531898
PG465	1 (99)	$P_{25}-N_{6}-(AACAAAC)_{1}-N_{36}-P_{25}$	EF540881
	2.3[a] (109)	$P_{25}-N_{6}-(AACAAAC)_{3}-N_{32}-P_{25}$	EF531900
PG525	1 (95)	$P_{22}-N_{28}-(AAC)_{1}-N_{19}-P_{23}$	EF540882
	6.1[a] (111)	$P_{22}-N_{35}-(AAC)_{4}-N_{19}-P_{23}$	EF531902
PG557	2 (161)	$P_{23}-N_{62}-(AAAAAAAAT)_{2}-N_{33}-P_{25}$	EF540883
	2.1[a] (162)	$P_{23}-N_{63}-(AAAAAAAAT)_{2}-N_{33}-P_{25}$	EF531904
	2.4[a] (166)	$P_{23}-N_{57}-(AAAT)_{7}-N_{33}-P_{25}$	EF540884
PG578	6 (180)	$P_{24}-N_{29}-(AG)_{6}-N_{95}-P_{20}$	EF531905
	7 (182)	$P_{24}-N_{29}-(AG)_{7}-N_{95}-P_{20}$	EF531906
PG628	6 (113)	$P_{22}-N_{10}-(AAG)_{6}-N_{41}-P_{22}$	EF531907
	10 (125)	$P_{22}-N_{10}-(AAG)_{10}-N_{41}-P_{22}$	EF531908
PG656	7 (156)	$P_{24}-N_{33}-(GAAA)_{7}-N_{47}-P_{24}$	EF531909
	9 (164)	$P_{24}-N_{33}-(GAAA)_{6}-N_{59}-P_{24}$	EF531910
PG772	4 (114)	$P_{22}-N_{21}-(AAG)_{4}-N_{37}-P_{22}$	–
	5 (118)	$P_{22}-N_{22}-(AAG)_{5}-N_{37}-P_{22}$	–
PG785	5 (89)	$P_{24}-N_{16}-(AG)_{5}-N_{15}-P_{24}$	EF540885
	8 (95)	$P_{24}-N_{16}-(AG)_{8}-N_{15}-P_{24}$	EF531914
	11 (101)	$P_{24}-N_{16}-(AG)_{11}-N_{15}-P_{24}$	EF531913
PG1058	3 (119)	$P_{25}-N_{20}-(ATTTT)_{1}-N_{19}-(ATAC)_{3}-N_{13}-P_{25}$	EF531916
	6.1[a] (132)	$P_{25}-N_{20}-(ATTTT)_{2}-N_{19}-(ATAC)_{5}-N_{13}-P_{25}$	EF531915
PG1129	5 (88)	$P_{21}-N_{13}-(AGG)_{2}(AG)_{5}-N_{17}-P_{21}$	EF540886
	8.1[a] (95)	$P_{21}-N_{13}-(AGG)_{3}(AG)_{7}-N_{17}-P_{21}$	EF540887
	15.1[a] (109)	$P_{21}-N_{13}-(AGG)_{3}(AG)_{14}-N_{17}-P_{21}$	EF540888
	16.1[a] (111)	$P_{21}-N_{13}-(AGG)_{3}(AG)_{15}-N_{17}-P_{21}$	EF531918
PG1306	6 (147)	$P_{23}-N_{23}-(AGAAATGAAA)_{1}-N_{17}-(TG)_{1}-N_{2}-(AAG)_{6}-N_{28}-P_{24}$	EF531920
	8 (153)	$P_{23}-N_{23}-(AGAAATGAAA)_{2}-N_{17}-(TG)_{2}-N_{2}-(AAG)_{4}-N_{28}-P_{24}$	EF540889
PG1335	7 (174)	$P_{24}-N_{16}-(AC)_{7}-N_{96}-P_{24}$	EF540890
	8 (176)	$P_{24}-N_{16}-(AC)_{8}-N_{96}-P_{24}$	EF531922
	9 (178)	$P_{24}-N_{16}-(AC)_{9}-N_{96}-P_{24}$	EF531921
PG1886	2 (168)	$P_{23}-N_{63}-(GAAATG)_{2}-N_{46}-P_{24}$	EF531924
	4 (180)	$P_{23}-N_{63}-(GAAATG)_{4}-N_{46}-P_{24}$	EF531923

[a]Alleles were designated by PCR size in accordance with other alleles in the same markers.

3. 다형성 SSR의 대립유전자 빈도 결정

가. 다형 SSR marker의 genotyping

선별된 12개 SSR marker의 변별력과 대립유전자의 변이의 다양성을 분석하기 위하여 재배삼 100 개체와 산삼 50개체를 수집하여 genomic DNA를 추출하고, 이를 주형으로 하여 유전자 타이핑을 각각 실시하였다. Fig. 7은 재배삼 100개체에 대한 PG668 마커의 PAGE에 이은 silver stain법으로 타이핑한 겔 사진을 보여준다.

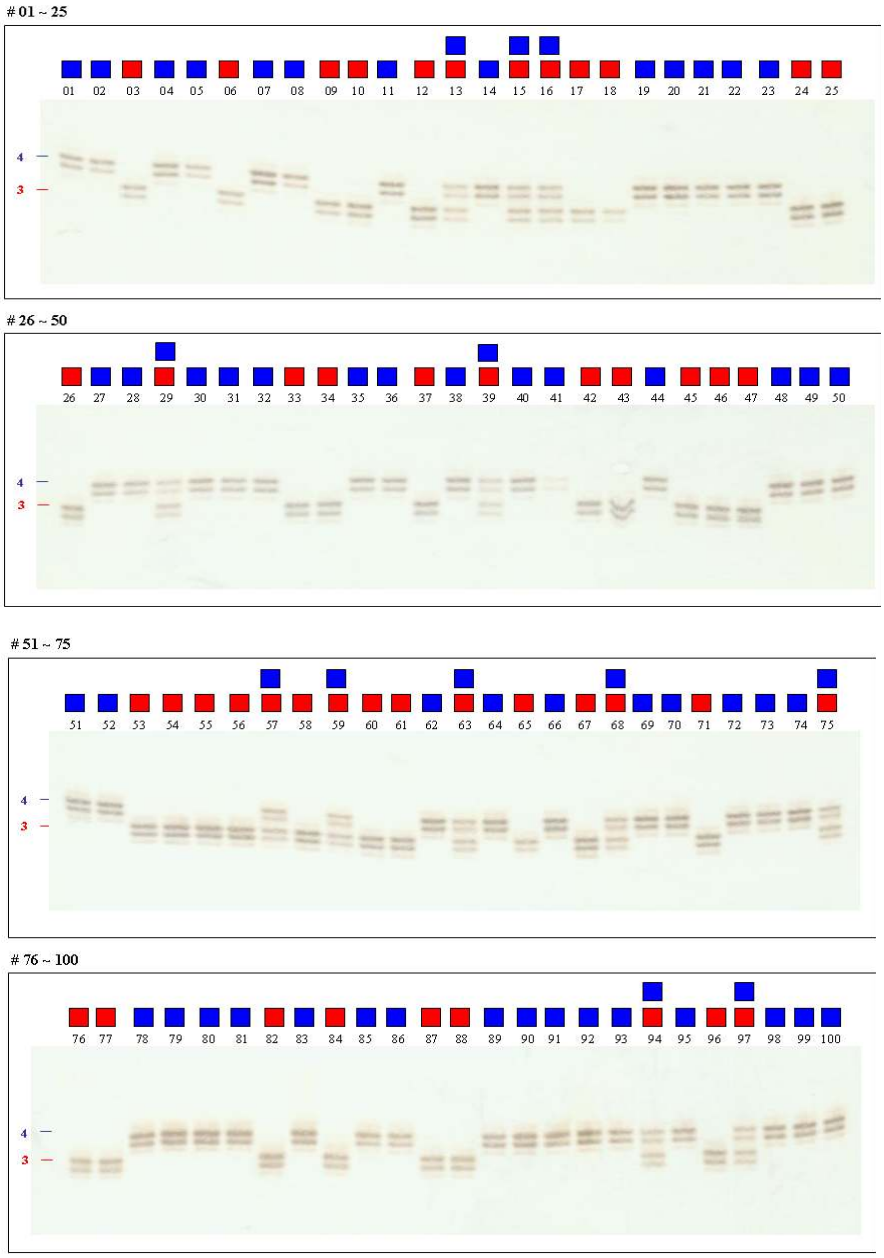


Fig. 7. Genotyping of PG668 marker by denatured PAGE and silver staining method in 100 samples of *P. ginseng* (Red box and blue box indicate allele 3 and 4, respectively).

나. 다형 SSR 좌위의 크로마토페로그램

각각의 SSR 마커는 변성 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동과 silver staining으로 처음 분석을 하였지만, 실험 소요시간의 많이 들고, 실험 과정이 번거로운 단점을 줄이기 위해 형광 표지 primer를 제작하여 타이핑하였다. 형광 표지된 primer는 증폭 산물의 크기가 다양하고 비교적 변별력이 높은 6개의 마커에 대해 제작하였고, 기존의 primer와 동일한 조건으로 PCR 증폭한 뒤 자동염기서열분석기 (ABI 3100 genetic analyzer, Applied Biosystems, USA)와 Genotyper 프로그램을 이용하여 분석하였다(VIC: PG29, PG281 and PG287, FAM: PG668 and PG1319, PET: PG1481). PAGE와 자동염기서열분석기로 분석된 결과를 서로 비교하였을 때 그 결과는 정확히 일치함을 보였다(Fig. 8). 따라서 형광 표지 primer로 유전자형을 분석하는 시스템이 인삼의 다형성 마커의 분석에 있어 매우 편리하고 유용하다는 것을 확인하였다.

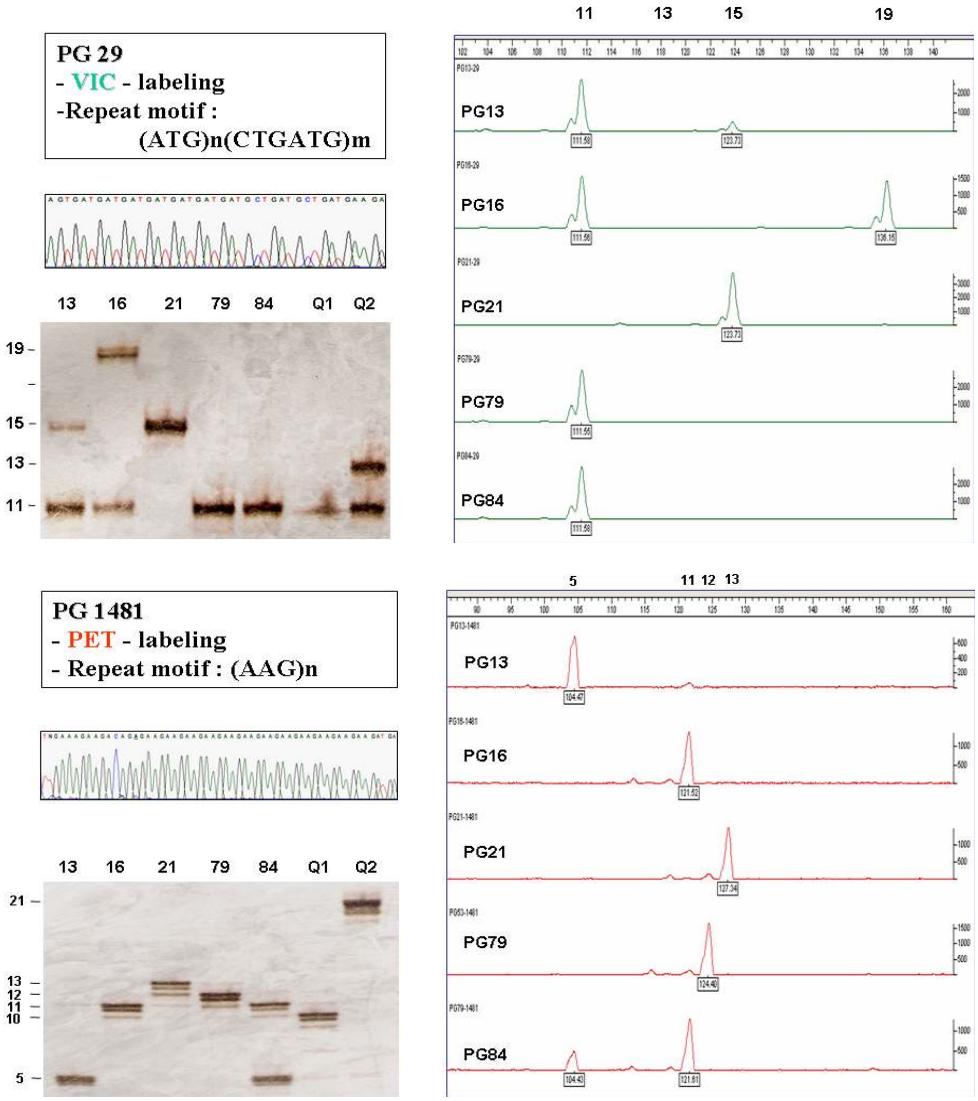


Fig. 8. Comparison of PAGE gel images with chromatopherograms by automatic sequencing analyzer.

다. 재배삼과 산삼에서 SSR 좌위의 대립유전자 빈도 비교

선별된 12개의 SSR marker 중, 상대적으로 변별력이 좋은 6 마커(PG29, PG281, PG287, PG668, PG1319, and PG1481)에 대해 형광 표지 primer와 자동염기서열 분석기를 이용한 genotyping을 재배삼 100개체 뿐 아니라 산삼 51개체에 대해서 조사하여 두 집단 간의 유전적 유사성에 대해 조사하였다(Fig. 9).

재배삼과 산삼에 대해 모두 대립유전자 빈도를 결정한 6 좌위에 대해서 보면, 총 27개의 대립유전자가 발견되었고, 좌위별 평균 대립유전자는 각각 4.16 과 3.83개로서 재배삼이 조금 높은 수치를 보였지만, 이것은 조사된 시료의 개수에 기인하는 것으로 본질적인 차이는 없는 것으로 사료되었다.

두 집단 간에 대립유전자 빈도가 비교된 6개의 마커 중 4 좌위 (PG29, PG287, PG668 and PG1319)에서는 발견된 대립유전자가 동일하였다. 그렇지만, PG281에서는 대립유전자 7과 16이 재배삼에서만 관찰되고, 반면 8과 10은 산삼에서만 발견되었다. PG1481 마커에서는 대립유전자 7과 10이 재배삼에서만 관찰되었다. 그런데 본 연구에서 조사한 산삼 집단의 크기가 50 시료 이하로 그렇게 높지 않기 때문에, 한 쪽 집단에서만 관찰된 이런 대립유전자들을 집단 특이적 마커로 보기는 어려운 것으로 보인다.

Gene diversity (GD)는 재배삼에서는 0.191 (PG1319)에서 0.578 (PG29) 범위를 보였으며, 평균은 0.438을 보였다. 한편, 산삼에서는 GD가 0.188 (PG1319)에서 0.531 (PG1481)의 범위로서 평균값은 0.454로서 재배삼보다 약간 높았지만 유의적인 차이는 보여주지 못했다. 재배삼에서 가장 높은 PIC 값은 PG29의 0.520이었으며, 다음으로는 PG1481의 0.450으로 평균값은 0.383이었다. 산삼 그룹에서 가장 높은 PIC 값은 PG29의 0.476이었으며 다음으로 PG1481의 0.474로 평균값은 0.392로서, 역시 재배삼보다는 약간 높은 값을 보였지만 유의성은 없었으며, 전반적으로 매우 낮음을 볼 수 있었다.

가장 많은 대립유전자는 PG281에서 보였지만 (n = 9), PG29가 가장 다형성이 높은 마커로 결정되었다 (GD = 0.575, PIC = 0.520, and PD = 0.670 in cultivated ginseng). 가장 변별력이 떨어지는 마커로는 PG1319로서 겨우 3개의 대립유전자만이 관찰되었다 (GD = 0.191, PIC = 0.177, and PD = 0.253).

예상 이형접합도 (H_{exp})는 재배삼에서 0.192−0.585 (평균값: 0.440), 산삼에서 0.192−0.540 (평균값: 0.460)을 보여 두 집단에서 유사한 값을 보였다. 그렇지만, 관측 이형접합도 (H_{obs})는 H_{exp}보다 훨씬 낮은 값을 보였다. 즉, 재배삼에서 0.070−0.150 (평균: 0.105), 산삼에서 0.069−0.220 (평균: 0.129)을 보여, 비록 산삼이 재배삼보다는 약간 높은 값을 보였지만, 두 집단 모두에서 이형접합성이 예상치에 비해 매우 낮음을 보여주었다. 재배삼은 물론 산삼에서도 조사된 모든 좌위에 대해 Hardy−Weinberg 평형상태에서 벗어남을 보였다 ($P < 0.001$)(Table 7).

이상의 결과를 볼 때, 재배삼과 산삼이 동일한 종으로서 유전적으로는 매우 가까우며, 최소한 SSR 마커로는 상호 구분이 어려울 수 있음을 보여주었다. 재배삼이 HWE에서 벗어났으며 이형접합도가 매우 낮은 이유는 15세기 이후부터 재배되면서 임의교배가 일어나

지 않았으며 인삼의 자가수분의 특성도 기여하였기 때문으로 고려된다. 반면, 산삼에서도 똑같은 현상이 관찰된 것은 다소 의외의 결과로서, 아마도 재배삼의 씨앗이 새 등의 동물에 의해 옮겨졌거나 넓은 산에 매우 드물게 분포하기 때문에 실제적인 타가수분이 제한된 때문으로 여겨진다.

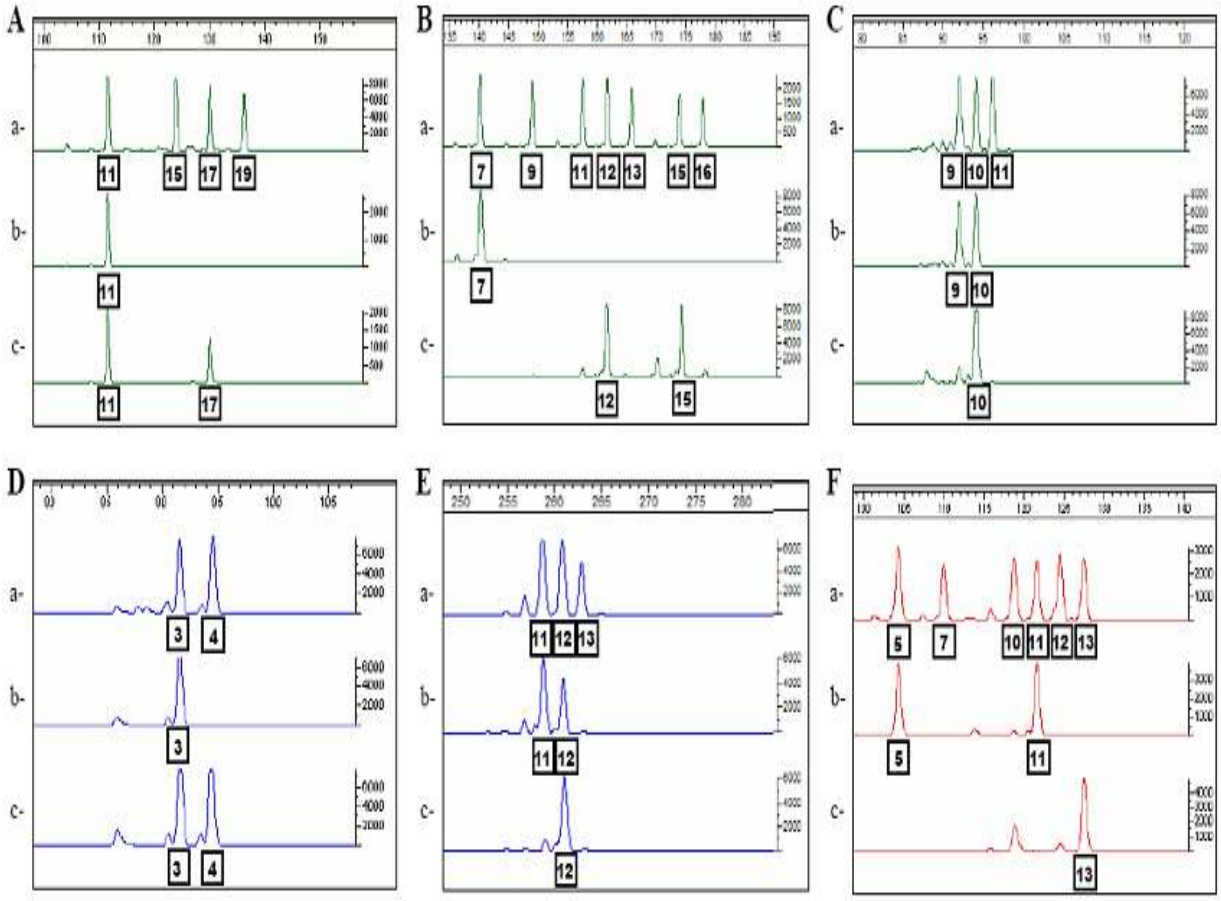


Fig. 9. Chromatopherograms of six microsatellites in *P. ginseng*. Each marker was amplified using fluorescent-labeling primer, and genotype was determined using an ABI 3100 genetic analyzer and Genotyper program (ver. 3.7). The DNA size ranges are shown at the top of the chromatopherograms. a: Standard allelic ladder. b and c show the examples of cultivated and wild ginseng, respectively. (A) PG29 (VIC), (B) PG281 (VIC), (C) PG287 (VIC), (D) PG668 (FAM), (E) PG1319 (FAM), and (F) PG1481 (PET).

Table 7. Allele frequencies of the 6 SSR markers in cultivated and wild ginseng.

Allele	PG29		PG281		PG287		PG668		PG1319		PG1481	
	CG[a]	WG[b]	CG	WG	CG	WG	CG	WG	CG	WG	CG	WG
3							0.390	0.461				
4							0.610	0.539				
5											0.140	0.233
7			0.020								0.005	-
8				0.020								
9			0.020	0.010	0.290	0.352						
10				0.010	0.690	0.625					0.005	-
11	0.585	0.636	0.120	0.140	0.020	0.023			0.090	0.086	0.685	0.633
12			0.725	0.690					0.895	0.897	0.145	0.117
13			0.015	0.040					0.015	0.017	0.020	0.017
15	0.170	0.114	0.070	0.090								
16			0.030	-								
17	0.020	0.023										
19	0.225	0.227										
H_{exp}[c]	0.581	0.536	0.455	0.499	0.442	0.490	0.478	0.502	0.192	0.192	0.492	0.540
H_{obs}[d]	0.150	0.136	0.090	0.220	0.100	0.114	0.120	0.137	0.070	0.069	0.100	0.100
HWE[e]	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01	>0.01
PIC[f]	0.520	0.476	0.431	0.465	0.359	0.387	0.363	0.373	0.177	0.176	0.450	0.474
PE[g]	0.018	0.015	0.007	0.035	0.008	0.011	0.012	0.015	0.004	0.004	0.010	0.008
PM[h]	0.330	0.375	0.480	0.386	0.478	0.424	0.426	0.394	0.747	0.750	0.443	0.413
PD[i]	0.670	0.625	0.520	0.614	0.522	0.576	0.574	0.606	0.253	0.250	0.557	0.587
GD[j]	0.578	0.530	0.453	0.494	0.439	0.485	0.476	0.497	0.191	0.188	0.490	0.531
Fst[k]	0.658		0.095		0.544		0.266		0.899		0.694	

[a]CG: cultivated ginseng, [b]WG: wild ginseng, [c]H_{exp}: expected heterozygosity, [d]H_{obs}: observed heterozygosity, [e]HWE: Hardy−Weinberg equilibrium, [f]PIC: polymorphism information contents, [g]PE: power of exclusion, [h]PM: matching probability, [i]PD: power of discrimination, [j]GD: gene diversity, [k]Fst: difference of allele distribution between two populations.

라. 재배삼에서의 SSR 마커의 대립유전자 분포도 조사

변별력이 높고 형광표지 primer의 제작으로 산삼시료에서도 타이핑이 가능했던 6개 마커 외에 6 좌위 중, 인삼 내에서의 변이 없이 산삼시료에서만 변이를 보였던 PG22를 제외한 5개 마커(PG186, PG770, PG946, PG1419, PG1663)에 대해 재배삼 100개체를 대상으로 대립유전자 분포도를 결정하였다.

PG186, PG770 및 PG946은 상대적으로 변별력이 떨어지는 마커들로서, 각각 대립유전자가 2개, 2개 및 3개만이 관찰되었고, PG1419는 5 마커 중 가장 많은 5개의 대립유전자가 관찰되었다. H_{obs}가 PG186, 1419에서는 0.120로서 다른 마커와 비슷하였지만, 나머지 두 마커는 0.040로서 매우 낮은 값을 보였다. 네 마커의 GD값은 차례로 0.461, 0.077, 0.159 및 0.538로서 PG1419가 제일 높은 값을 보였다. 한편 PG1663은 비교적 변별력은 양호하지만, 일부 재배삼 시료에서 3개의 대립유전자가 동시에 출현하는 등 2개 이상의 종복좌위로 구성된 것으로 예상되어 개별적 좌위의 대립유전자 빈도를 구하기 어려웠기 때문에 두 좌위의 복합으로 나타난 대립유전자의 존재 유무로서 결정하였다(Table 8).

Table 8. Allele frequencies of three microsatellite markers in cultivated *P. ginseng*.

Allele	PG186	PG770	PG946	PG1419	Genotype	PG1663
6	0.640	0.960			4-4	0.010
7	0.360	0.040			4-5	0.130
8			0.040		5-5	0.030
11			0.915		5-6	0.700
12			0.045		5-7	0.020
14				0.030	6-6	0.020
18				0.595	4-5-6	0.090
19				0.325		
20				0.035		
21				0.015		
H_{exp}	0.463	0.077	0.160	0.541		-
H_{obs}	0.120	0.040	0.040	0.120		-
HWE	>0.001	>0.005	>0.001	>0.001		-
PIC	0.350	0.070	0.150	0.460		-
PE	0.012	0.001	0.001	0.012		-
PM	0.441	0.886	0.813	0.380		-
PD	0.559	0.114	0.187	0.620		-
GD	0.461	0.077	0.159	0.538		-

마. 중복 좌위로 예상되는 SSR 좌위

최근에 한국의 인삼에 대한 microsatellite marker에 대해 보고된 내용을 보면, H_{obs} (0.554)가 H_{exp} (0.502)보다 더 높으며, 본 연구에서의 결과보다 훨씬 높은 수치를 보여 주었다. 심지어 3개의 마커에서는 H_{obs}가 1.000으로 조사되었다(Ma et al., 2007). 이와 같은 결과는 인삼의 특성상 매우 이해하기 어려운 결과로서, 아마도 중복좌위들에 대한 타이핑 오류로 기인하는 것으로 여겨진다.

본 사업에서도 많은 중복 좌위로 예상되는 SSR 마커들을 분리하였다(Fig. 10).

PG557 마커는 모든 시료에서 동일한 두 밴드를 보여 유사한 두 비다형성 마커가 존재하는 것으로 여겨지며(Fig. 10A), PG525는 3 개의 동일한 밴드를 보여 인삼의 유전체에 이 마커에 대한 3 개의 복사체(좌위)가 존재하는 것으로 여겨진다(Fig. 10B). PG1988은 여러 밴드를 보여 4 개 이상의 비다형성 복사체를 가지는 것으로 보이며(Fig. 10C), PG287은 위쪽의 다형성 좌위와 아래쪽의 비다형성 좌위로 구성된 것으로 보인다(Fig. 10D). PG770은 PG287과는 반대로 아래쪽의 다형성 좌위와 위쪽의 비다형성 좌위로 구성된 것으로 여겨진다(Fig. 10E). PG1663의 경우는 정확하게 동일한 대립유전자 구조를 가지는 두 다형성 좌위 (P_{F24}−N_{55}−[CTCCTTT]$_n$−N_{40}−P_{R24})의 복합된 패턴으로 여겨진다(Fig. 10F).

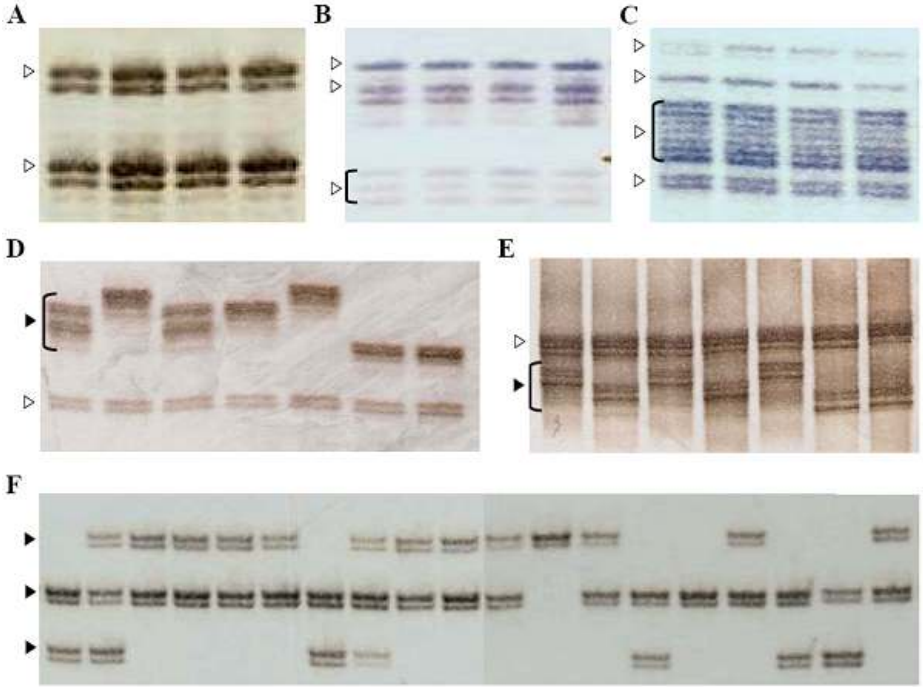


Fig. 10. Microsatellite markers of putative multi−loci in *P. ginseng*. Each marker was amplified with a non−labeled primer pair, and the PCR products were separated on a 5% denaturing polyacrylamide gel and visualized by the silver staining. Black(▶) and open (▷) arrow heads indicate polymorphic and monomorphic DNA fragments, respectively. (A) PG557, (B) PG525, (C) PG1988, (D) PG287, (E) PG770, and (F) PG1663.

바. SSR 좌위의 combined genotyping 및 개체별 변별력

재배삼에 대해 대립유전자의 빈도를 확인할 수 있는 10개 SSR 좌위와 변별력은 높지만 복합 좌위로 생각되는 3개 이상의 대립유전자가 한꺼번에 출현했던 1개의 SSR 좌위에 대한 복합 유전자형(combined genotype)을 결정하여 각 복합 유전자형이 출현할 빈도, 즉 개체 변별력을 조사하였다(Table 9). 인삼의 전반적인 SSR의 다형성은 낮았지만, 11 마커에 대한 복합 변별력은 매우 우수함을 보여주었는데, 최저 10^{-4}에서 최대 10^{-14}까지 개체에 따라 변별력은 상당한 차이를 보였다. 본 연구 결과를 볼 때, 11 좌위 SSR 하플로타입의 ID 시스템을 도입한다면, 산삼 배양근과 같은 부가가치가 높은 가공제품의 유전적 족보를 충분히 입증할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 9. Combined discrimination powers of 11 SSR markers

마커 / 개체	PG29	PG186	PG281	PG287	PG668	PG770	PG946	PG1319	PG1419	PG1481	PG1663	결합 변별력
1	0.051	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.008	0.106	0.469	0.700	4.18×10^{-7}
2	0.077	0.130	0.102	0.476	0.372	0.922	0.837	0.161	0.354	0.469	0.700	2.61×10^{-6}
3	0.029	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.161	0.354	0.469	0.700	6.53×10^{-6}
4	0.029	0.410	0.526	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.021	0.700	6.29×10^{-7}
5	0.263	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	7.22×10^{-4}
6	0.342	0.410	0.102	0.400	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.090	8.03×10^{-6}
7	0.190	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.020	4.46×10^{-6}
8	0.029	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.002	0.801	0.106	0.469	0.700	5.69×10^{-8}
9	0.342	0.410	0.005	0.476	0.152	0.922	0.002	0.801	0.354	0.469	0.700	8.71×10^{-9}
10	0.342	0.410	0.526	0.084	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	6.77×10^{-5}
11	0.342	0.410	0.526	0.400	0.372	0.922	0.837	0.801	0.387	0.469	0.700	8.62×10^{-4}
12	0.342	0.130	0.014	0.084	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	5.71×10^{-7}
13	0.199	0.461	0.102	0.476	0.476	0.077	0.073	0.801	0.354	0.020	0.700	4.73×10^{-8}
14	0.051	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	1.40×10^{-4}
15	0.199	0.461	0.526	0.400	0.476	0.922	0.837	0.801	0.387	0.192	0.700	2.95×10^{-4}
16	0.263	0.461	0.526	0.400	0.476	0.077	0.837	0.801	0.387	0.469	0.700	7.96×10^{-5}
17	0.342	0.410	0.0009	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.192	0.020	1.88×10^{-8}
18	0.342	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.387	0.469	0.700	1.03×10^{-3}
19	0.029	0.130	0.014	0.084	0.372	0.922	0.837	0.161	0.106	0.001	0.700	1.52×10^{-11}
20	0.051	0.130	0.014	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	2.08×10^{-7}
21	0.029	0.130	0.005	0.476	0.372	0.922	0.837	0.008	0.354	0.0004	0.030	8.75×10^{-14}
22	0.263	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.387	0.469	0.700	7.89×10^{-4}
23	0.342	0.410	0.014	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.021	0.700	1.97×10^{-7}
24	0.029	0.410	0.005	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.0004	0.700	2.64×10^{-10}
25	0.342	0.461	0.174	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	1.43×10^{-4}

마커 / 개체	PG29	PG186	PG281	PG287	PG668	PG770	PG946	PG1319	PG1419	PG1481	PG1663	결합 변별력
26	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.700	1.15×10^{-4}
27	0.342	0.410	0.526	0.476	0.372	0.002	0.837	0.801	0.387	0.020	0.700	9.49×10^{-8}
28	0.029	0.130	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.010	1.08×10^{-7}
29	0.342	0.130	0.526	0.084	0.476	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	6.72×10^{-5}
30	0.199	0.461	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.008	0.001	0.192	0.700	7.09×10^{-9}
31	0.342	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.130	5.22×10^{-5}
32	0.342	0.410	0.014	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.130	4.64×10^{-6}
33	0.342	0.130	0.002	0.084	0.152	0.002	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	1.77×10^{-10}
34	0.051	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	5.72×10^{-5}
35	0.051	0.410	0.526	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.700	7.39×10^{-6}
36	0.342	0.461	0.022	0.400	0.372	0.077	0.837	0.801	0.387	0.469	0.090	4.35×10^{-7}
37	0.029	0.130	0.0009	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.090	6.79×10^{-10}
38	0.199	0.461	0.526	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.007	0.700	4.84×10^{-7}
39	0.051	0.130	0.174	0.084	0.476	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	3.31×10^{-6}
40	0.029	0.461	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.387	0.021	0.090	5.63×10^{-7}
41	0.051	0.410	0.526	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.001	0.199	0.090	3.80×10^{-9}
42	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.020	0.700	1.63×10^{-5}
43	0.342	0.130	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.130	6.76×10^{-6}
44	0.342	0.130	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.0002	0.106	0.469	0.700	2.22×10^{-8}
45	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.021	0.700	1.72×10^{-5}
46	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	3.83×10^{-4}
47	0.342	0.130	0.005	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.130	2.15×10^{-7}
48	0.051	0.410	0.014	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.020	5.62×10^{-9}
49	0.342	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	9.38×10^{-4}
50	0.029	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.008	0.354	0.469	0.700	7.95×10^{-7}
51	0.342	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.021	0.700	4.20×10^{-5}
52	0.051	0.130	0.0004	0.476	0.372	0.922	0.002	0.801	0.354	0.021	0.130	6.70×10^{-13}
53	0.023	0.410	0.526	0.400	0.152	0.922	0.073	0.161	0.354	0.021	0.090	2.19×10^{-9}
54	0.0004	0.410	0.526	0.084	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	7.91×10^{-8}
55	0.342	0.410	0.014	0.084	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	1.80×10^{-6}
56	0.051	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	5.72×10^{-5}
57	0.263	0.461	0.526	0.400	0.476	0.922	0.073	0.801	0.042	0.469	0.700	9.03×10^{-6}
58	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.020	0.130	3.04×10^{-6}
59	0.051	0.461	0.526	0.400	0.476	0.922	0.837	0.801	0.036	0.469	0.090	2.21×10^{-6}
60	0.029	0.461	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.021	0.700	1.64×10^{-6}
61	0.263	0.461	0.526	0.084	0.152	0.922	0.002	0.801	0.354	0.469	0.700	1.40×10^{-7}
62	0.051	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.002	0.801	0.106	0.469	0.700	1.00×10^{-7}
63	0.342	0.130	0.526	0.476	0.476	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	3.81×10^{-4}
64	0.051	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.700	4.19×10^{-5}
65	0.342	0.130	0.526	0.476	0.152	0.922	0.002	0.801	0.106	0.020	0.700	3.71×10^{-9}

마커 / 개체	PG29	PG186	PG281	PG287	PG668	PG770	PG946	PG1319	PG1419	PG1481	PG1663	결합 변별력
66	0.029	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.008	0.354	0.021	0.700	3.56×10^{-8}
67	0.029	0.410	0.526	0.084	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	5.74×10^{-6}
68	0.051	0.410	0.526	0.084	0.476	0.922	0.004	0.027	0.001	0.469	0.090	1.85×10^{-12}
69	0.342	0.130	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.020	0.130	7.05×10^{-7}
70	0.263	0.130	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.161	0.106	0.469	0.700	1.38×10^{-5}
71	0.342	0.130	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	1.22×10^{-4}
72	0.342	0.130	0.0004	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	2.26×10^{-7}
73	0.342	0.410	0.526	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.700	4.96×10^{-5}
74	0.342	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.008	0.354	0.469	0.700	9.37×10^{-6}
75	0.009	0.410	0.174	0.400	0.476	0.922	0.837	0.801	0.106	0.021	0.700	1.18×10^{-7}
76	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.001	0.469	0.700	1.08×10^{-6}
77	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.700	1.15×10^{-4}
78	0.051	0.130	0.0004	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.700	1.01×10^{-8}
79	0.342	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.192	0.130	7.13×10^{-5}
80	0.342	0.130	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.021	0.700	1.33×10^{-5}
81	0.051	0.410	0.014	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.199	0.130	8.79×10^{-8}
82	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.130	2.13×10^{-5}
83	0.342	0.410	0.526	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.021	0.700	2.22×10^{-6}
84	0.342	0.410	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	3.83×10^{-4}
85	0.342	0.410	0.014	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.0002	0.020	0.700	1.06×10^{-10}
86	0.263	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.387	0.469	0.700	7.89×10^{-4}
87	0.342	0.130	0.0009	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.001	0.469	0.700	5.88×10^{-10}
88	0.342	0.130	0.526	0.476	0.152	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	1.22×10^{-4}
89	0.051	0.410	0.014	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.469	0.020	5.62×10^{-9}
90	0.051	0.410	0.174	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.020	0.700	3.48×10^{-7}
91	0.342	0.130	0.005	0.0004	0.372	0.922	0.837	0.801	0.106	0.020	0.130	5.64×10^{-12}
92	0.342	0.130	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.020	0.030	5.44×10^{-7}
93	0.029	0.130	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.001	0.469	0.700	7.13×10^{-8}
94	0.342	0.410	0.102	0.400	0.476	0.922	0.837	0.801	0.106	0.192	0.130	4.45×10^{-6}
95	0.342	0.410	0.526	0.084	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.130	3.07×10^{-5}
96	0.342	0.130	0.526	0.476	0.152	0.077	0.837	0.801	0.354	0.021	0.700	4.55×10^{-7}
97	0.342	0.130	0.0004	0.476	0.476	0.922	0.837	0.801	0.354	0.020	0.700	1.23×10^{-8}
98	0.342	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.030	4.02×10^{-5}
99	0.342	0.130	0.526	0.0004	0.372	0.922	0.837	0.801	0.354	0.469	0.700	2.50×10^{-7}
100	0.199	0.410	0.526	0.476	0.372	0.922	0.837	0.161	0.354	0.192	0.090	5.78×10^{-6}

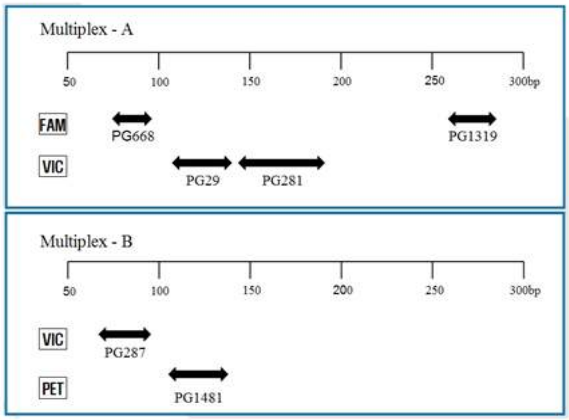
4. 인삼 SSR 마커의 multiplex PCR system의 개발

유전적 마커로서의 가치 및 실용성이 입증된 SSR 마커들에 대해 다중동시 증폭 위한 'multiplex PCR 증폭 system'을 개발하였다. 유전자 다중동시 증폭 시스템은 SSR 마커-특이적 primer를 FAM, VIC, PET으로 형광표지시키고, 증폭물의 크기가 서로 중복될 경우는 서로 다른 Big-dye로 표지하였고, 4개의 마커를 동시 증폭할 수 있는 tetraplex kit과 2개의 마커를 동시 증폭가능하게 하는 duplex kit을 개발하여 2번의 PCR 증폭으로 6개의 좌위를 동시에 확인할 수 있도록 하였다(Fig. 11). 이는 보다 실험과정의 축소로 인한 간편성과 실험 시간의 단축 그리고 비용절감 및 적은 양의 시료로부터 민감한 검색 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

(A)

Locus	Labeling	Concentration (μM)	TM (℃)
Tetraplex - A			
PG29	VIC	2.00	58
PG281	VIC	2.00	
PG668	FAM	1.00	
PG1319	FAM	2.00	
Doubleplex - B			
PG287	VIC	2.00	62.5
PG1481	PET	0.50	

(B)



(C)

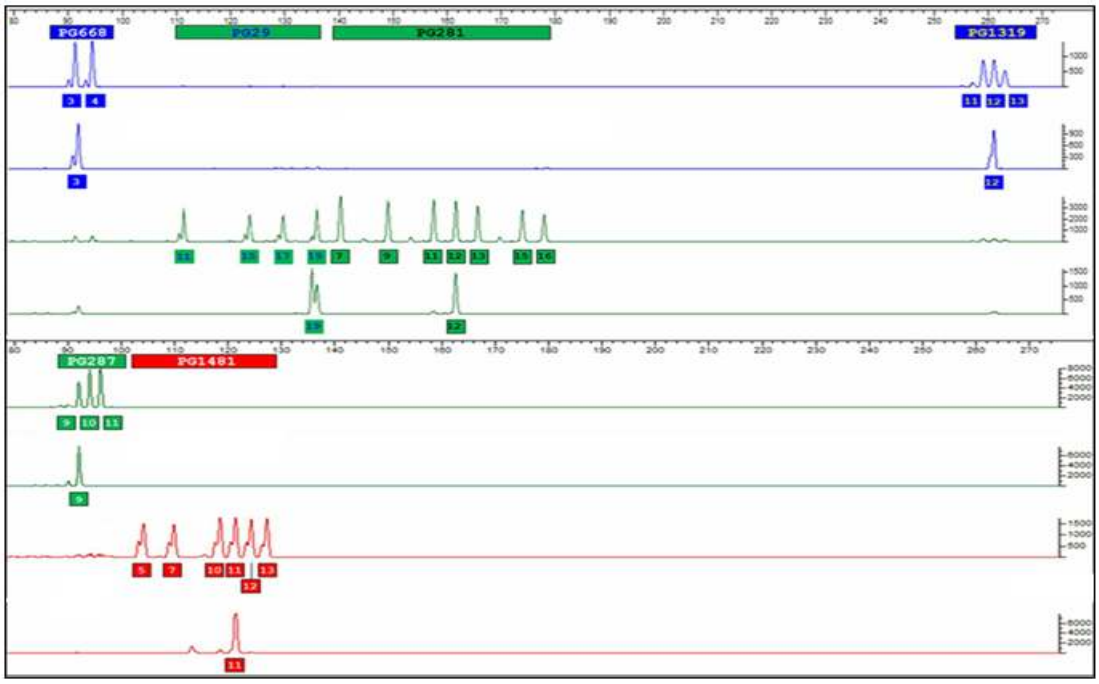
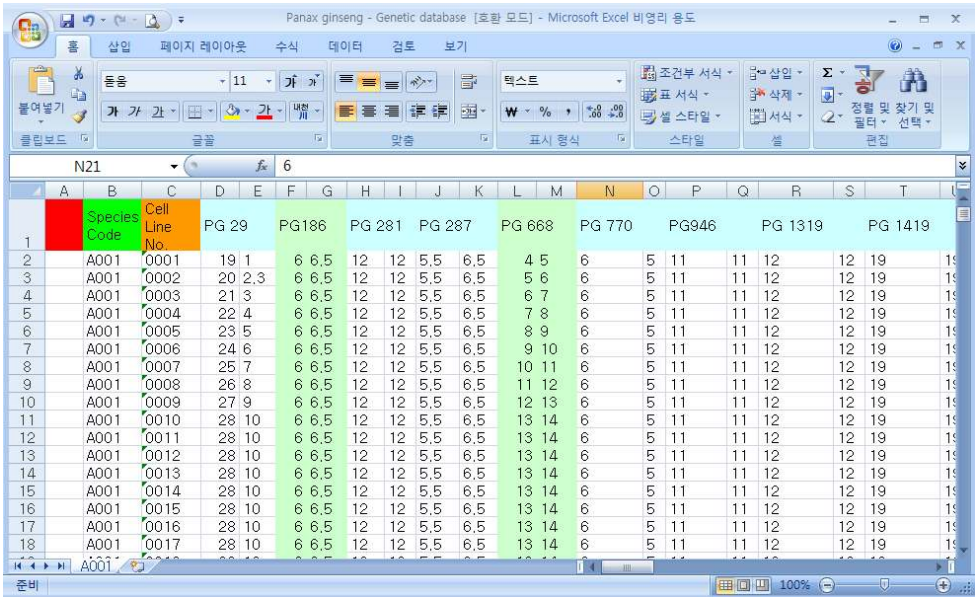


Fig. 11. Development of the multiplex PCR system in *P. ginseng*. A. Primer concentration and annealing temperature(TM) for multiplex PCR. B. Diagram of PCR product size. C, Electropherograms of the multiplex PCR system.

5. SSR 하플로타입 DNA ID의 Bar-code 시스템 개발

가. Database 구축

본 연구 결과에서 개발된 변별력 있는 11개의 SSR 마커를 이용하여 인삼의 복합 유전자형 결과를 토대로 유전자형 ID를 부여하고 2차원 바코드로 표현하는 시스템을 개발하였다. 각각의 마커들의 유전자형을 work Sheet로 정리하여 일괄 정리할 수 있도록 데이터베이스화하여 파일로 작성하였다. 이때 작성된 데이터베이스 정보는 바코드 제작에 적용하여 이용 가능하도록 일정한 형식에 맞춰 일괄등록하고, 컴퓨터를 통해 update가 가능하도록 하였다(Fig. 12).



	Species Code	Cell Line No.	PG 29	PG186	PG 281	PG 287	PG 668	PG 770	PG946	PG 1319	PG 1419
2	A001	0001	19 1	6 6,5	12 12	5,5 6,5	4 5	6 5	11 11	12 12	19 19
3	A001	0002	20 2,3	6 6,5	12 12	5,5 6,5	5 6	6 5	11 11	12 12	19 19
4	A001	0003	21 3	6 6,5	12 12	5,5 6,5	6 7	6 5	11 11	12 12	19 19
5	A001	0004	22 4	6 6,5	12 12	5,5 6,5	7 8	6 5	11 11	12 12	19 19
6	A001	0005	23 5	6 6,5	12 12	5,5 6,5	8 9	6 5	11 11	12 12	19 19
7	A001	0006	24 6	6 6,5	12 12	5,5 6,5	9 10	6 5	11 11	12 12	19 19
8	A001	0007	25 7	6 6,5	12 12	5,5 6,5	10 11	6 5	11 11	12 12	19 19
9	A001	0008	26 8	6 6,5	12 12	5,5 6,5	11 12	6 5	11 11	12 12	19 19
10	A001	0009	27 9	6 6,5	12 12	5,5 6,5	12 13	6 5	11 11	12 12	19 19
11	A001	0010	28 10	6 6,5	12 12	5,5 6,5	13 14	6 5	11 11	12 12	19 19
12	A001	0011	28 10	6 6,5	12 12	5,5 6,5	13 14	6 5	11 11	12 12	19 19
13	A001	0012	28 10	6 6,5	12 12	5,5 6,5	13 14	6 5	11 11	12 12	19 19
14	A001	0013	28 10	6 6,5	12 12	5,5 6,5	13 14	6 5	11 11	12 12	19 19
15	A001	0014	28 10	6 6,5	12 12	5,5 6,5	13 14	6 5	11 11	12 12	19 19
16	A001	0015	28 10	6 6,5	12 12	5,5 6,5	13 14	6 5	11 11	12 12	19 19
17	A001	0016	28 10	6 6,5	12 12	5,5 6,5	13 14	6 5	11 11	12 12	19 19
18	A001	0017	28 10	6 6,5	12 12	5,5 6,5	13 14	6 5	11 11	12 12	19 19

Fig. 12. SSR haplotype ID database of *P. ginseng* samples using 11 SSR markers.

나. DNA ID Bar-code의 출력 프로그램의 제작

바코드는 초기에는 인쇄된 문자나 숫자 등의 데이터를 컴퓨터에 자동으로 입력시키는 방법으로 개발되었으나 최근에는 다량의 데이터를 가장 정확하고 빠르게 입력 관리할 수 있는 강력한 방법으로 많은 분야에 적용되고 있다. 바코드화 된 다량의 정보들은 손쉽게 주 컴퓨터로 실시간처리(On-Line Real Time)가 가능할 뿐만 아니라 데이터베이스와의 연동을 통해 필요에 따른 정확한 상황을 즉시 알아낼 수 있기 때문에 적정재고 유지, 효율적 입, 출하관리, 효과적 판매관리가 가능할 수 있다. 이처럼 바코드 시스템을 이용한 경제적이고 효율적인 정보입력방식을 고려인삼의 고유 유전자 암호(Genetic ID)정보를 빠르고 정확하게 관리하는데 적용하여 보다 효율적인 관리와 우수한 고려인삼의 신뢰성 증대 효과를 얻을 수 있다.

11 SSR 마커를 통해 분석된 고려인삼의 유전자형 데이터베이스 내의 정보를 **2차원 바**

코드 형태로 변환하여 출력하도록 해주는 출력 프로그램을 제작하였다(한국전자인식, KEID; http://www.keid.co.kr). 구축된 고려인삼의 유전자형 데이터베이스를 바코드 출력 프로그램에 적용하고 전용프린터(PF8t, Intermec, USA)를 이용하여 고유 바코드를 출력할 수 있다. 이때 각각의 시료에 대한 부분 선택을 함으로써 선택적 출력을 하거나 특정 범위 내의 구간선택에 의한 구간선택 출력도 가능하도록 프로그램을 제작하였다(Fig. 13).

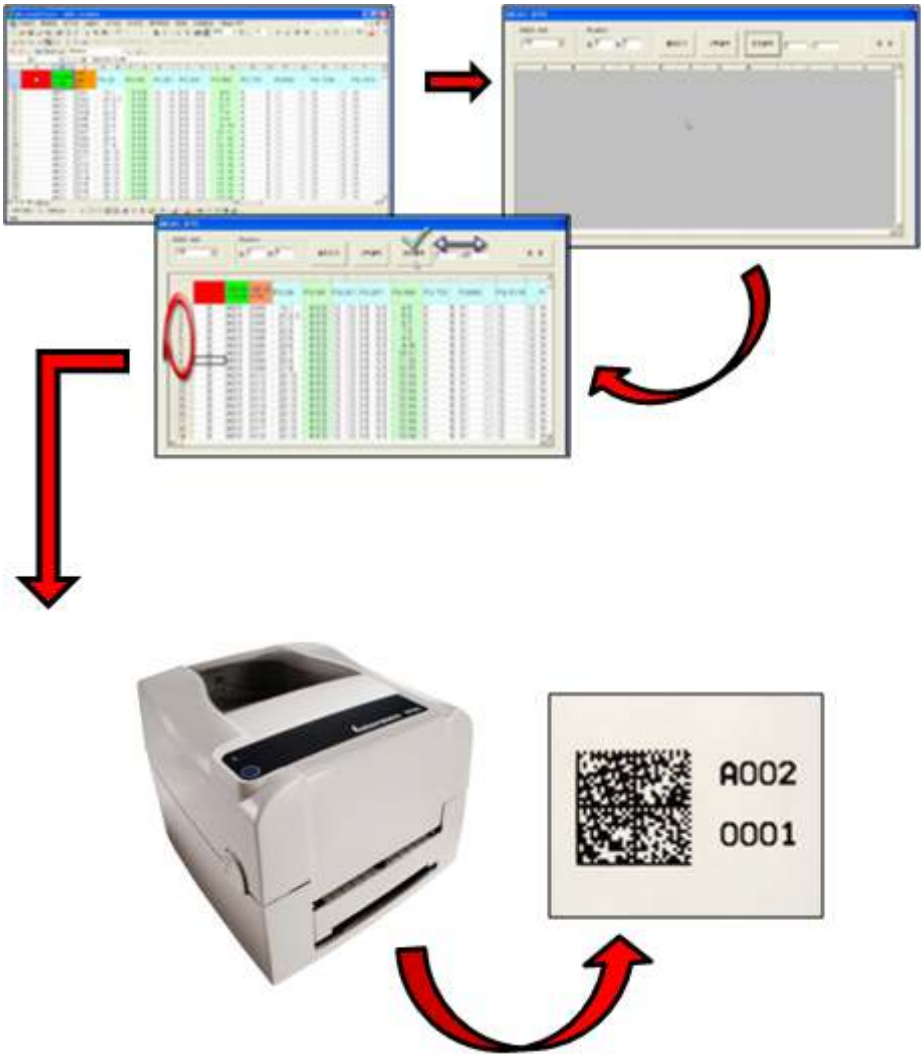


Fig. 13. Development of bar-code printing system and application of genetic database in *P. ginseng*

다. 바코드의 인식 및 확인을 위한 데이터의 재입력

인삼의 SSR 하플로타입 유전자형 ID 정보를 포함하고 있는 출력 바코드는 전용 바코드 인식 스캐너(DS6608, Symbol Technologies Inc., USA)를 이용하여 읽어낼 수 있다(Fig. 14). 스캐너를 통해 컴퓨터의 문자로 인식된 값은 텍스트 형태로 전송되고, 문자열을 그대로 일괄 처리 프로그램(마이크로 소프트 엑셀)으로 불러와 간편하면서도 빠르고 정확한 고유 유전자 ID를 인식하고, 재처리 가능하다. 이와 같이, 인삼류의 유전자형을 ID로 바코드화 하여 활용함으로써 유전자 데이터의 빠르고 쉬운 처리 운용과 더불어, 유전자원의 가공제품 또는 유사 품종의 생산, 유통에 있어 그 신뢰성의 증대 효과뿐만 아니라 유전적 계보의 추적에 매우 유용한 시스템이 될 것으로 사료된다. 예를 들면, 참여기업인 CBN 바이오텍(주)가 생산하는 산삼배양근 모든 제품의 용기에 DNA ID에 대한 2차원 바코드를 표기함으로서, 구매자의 신뢰를 높일 수 있을 것이다. 만약 구매자가 의문을 제기하면, 그 제품으로부터 DNA를 추출한 후, SSR 하플로타입을 결정하여 바코드가 암호화하고 있는 하플로타입과 일치하는 지를 확인함으로서 진위 여부는 정확하게 결정될 수 있다.

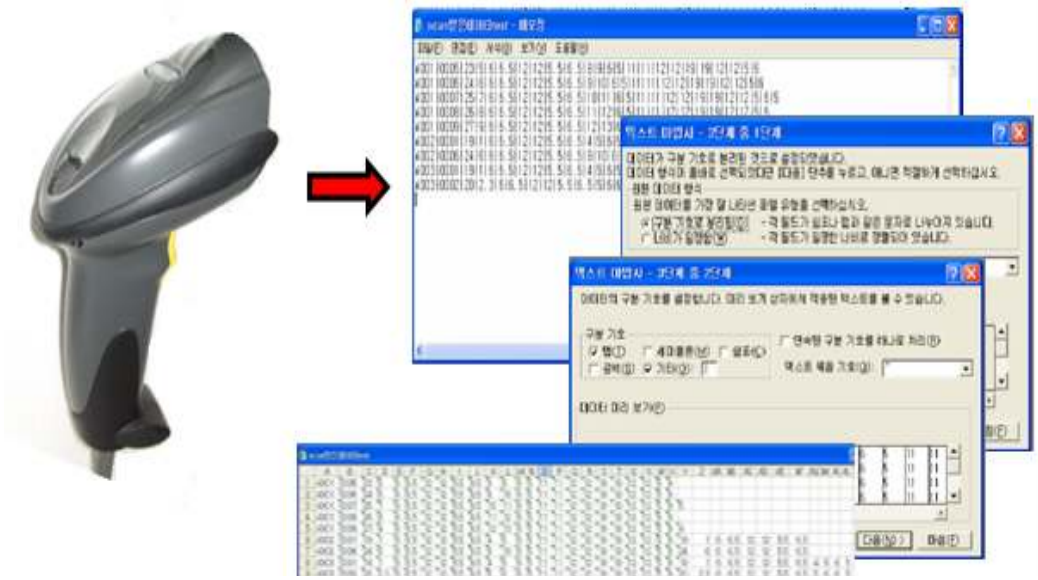


Fig. 14. Cognition of printed label and re-progress of genetic informations using the laser scanner.

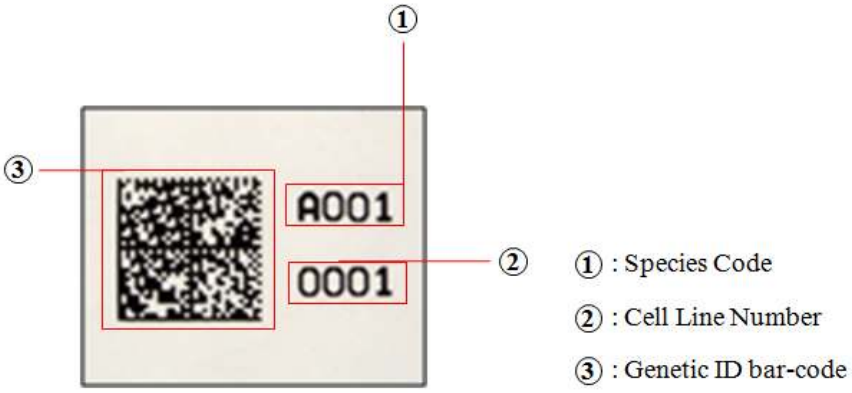
라. 산삼배양근의 DNA 바코드 생산과 활용

(주) CBN 바이오텍에서 제공한 산삼배양근 분말로부터 DNA를 추출하고, 본 연구에서 개발된 11 SSR marker를 이용하여 genotyping을 수행하였다. 제공된 산삼배양근의 유전자형은 기존 실험에 사용되었던 100개의 인삼개체의 유전자형 database 내의 11좌위에 대

해 동일한 복합 유전자형은 발견되지 않았다. 앞서 제작된 출력프로그램을 이용하여 산삼 배양근의 고유 유전자 ID를 갖는 DNA 2차원 바코드를 출력하였다(Fig. 15).

본 연구의 DNA 바코드 시스템은 종(種)번호 및 시료의 번호를 일련 처리하기 때문에 추후 인삼뿐만 아니라 다양한 생물시료에의 유전정보 관리 시스템으로도 그 활용도가 매우 높을 것으로 사료된다.

(A)



(B)

PG29	PG186	PG281	PG287	PG668	PG770	PG946	PG1319	PG1419	PG1481	PG1663
19/19	7/7	12/12	9/9	3/3	6/6	11/11	12/12	19/19	11/11	4/5/6

Fig. 15. DNA bar-code of wild adventitious roots. A. DNA bar-code, B. SSR haplotype ID.

제 3 절 압출성형 공정을 이용한 산삼배양근의 홍삼화공정 및 고기능성 식품소재개발

1. 홍삼화를 위한 압출성형 산삼배양근의 이화학적 성질 및 침출특성 분석

가. 일반성분

각 인삼시료의 총당, 환원당 총아미노산 함량은 Table 10과 같다. 총당은 홍삼이 28.83±0.05 mg/g, 산삼배양근이 10.97±0.18 mg/g로 측정되었다. 산삼배양근을 압출성형하였을 때 배럴온도 110℃에서 11.82±0.18 mg/g, 120℃에서는 14.53±0.20 mg/g로 측정되었다. 본 실험에서는 산삼배양근을 압출성형하였을때 총당의 함량이 증가함을 보였다. Jang과 Moon(2005)은 인삼의 다당체가 홍삼 제조 과정 중의 하나인 증숙에 의해 가용화되기 쉬운 상태로 되어 다른 인삼류보다 더 많이 추출되어 총당의 함량이 증가하는 것이라 보고하였다. 압출성형 역시 홍삼 제조공정에 투입되는 열과 압력 등의 물리적인 작용이 가해지는 공정이기 때문에 압출성형하지 않은 산삼배양근보다 압출성형 공정을 통한 산삼배양근의 총당 함량이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 압출성형을 통하여 총당 함량이 증가하였으며, 배럴온도가 110℃에서 120℃로 증가함에 따라 증가량이 커짐을 확인할 수 있었다.

Table 10. Content of chemical properties of various ginseng samples

Ginseng samples	Barrel temp.(℃)	Total sugar (mg/g)	Reducing sugar (mg/g)	Total amino acid (㎍/g)
Tissue cultured mountain ginseng	–	10.97±0.18	0.42±0.01	40.41±1.18
Extruded tissue cultured mountain ginseng	110	11.82±0.18	0.48±0.02	39.71±1.71
	120	14.53±0.20	0.45±0.00	34.92±2.11
Red ginseng	–	28.83±0.05	3.16±0.07	27.03±2.52

환원당 함량은 홍삼(3.16±0.07 mg/g)이 가장 높았고, 산삼배양근(0.42±0.01 mg/g)이 가장 낮았다. 산삼배양근을 압출성형하였을 때 배럴온도 110℃에서는 0.48±0.02 mg/g, 배럴온도 120℃에서는 0.45±0.00 mg/g로 증가하였다. 산삼배양근의 환원당 함량은 압출성형을 통하여 증가를 하였고, 배럴온도가 증가하였을 때 환원당 함량의 증가량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

Ha와 Ryu(2005)는 수삼을 압출성형하였을 때 환원당 함량이 미세하게 증가하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 압출성형을 통하여 환원당 함량이 미세하게 증가하였고, 이러한 원인은 압출성형에 의한 환원당 함량의 증가는 압출성형공정 중에 작용하는 열과 수분에 의한 전분의 호화와 스크루의 회전과 마찰열에 의한 전분사슬의 절단으로 인한 것으로 판단되며, 배럴온도가 증가하였을 때 환원당의 증가가 감소하는 것은 온도가 높아질수록 갈변화가 많이 진행되어 환원당의 소비에 따른 것으로 보인다.

홍삼과 비교하여 산삼배양근의 총당, 환원당 함량이 낮은 이유는 전분을 비롯한 당류 함량이 높은 주근이 포함된 홍삼에 비하여 산삼배양근은 인삼의 미삼과 같은 미세근으로 이루어져 있어 전분 등의 당류 함량이 낮기 때문으로 판단된다.

총아미노산은 홍삼이 산삼배양근 및 압출성형 배양근과 비교하여 낮게 측정되었다. 원료 산삼배양근의 아미노산 함량이 40.41±1.18 ㎍/g로 가장 높았으며 압출성형후 산삼배양근의 총아미노산 함량은 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 배럴온도가 110℃에서 120℃로 증가함에 따라 총아미노산 함량은 39.71±1.71 ㎍/g에서 34.92±2.11 ㎍/g로 감소하였다.

Ha와 Ryu(2005)는 압출성형과정을 통하여 투입되는 기계적 에너지와 열에너지에 따라 총아미노산이 변성되어 다른 성분으로 전환되어 감소한다고 보고하였고, 본 연구에서도 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 압출성형과정을 통해 아미노산과 당류의 결합에 의한 다른 물질로의 전환이 압출성형 산삼배양근의 총아미노산 함량 감소의 원인으로 판단된다.

나. 조사포닌 함량

인삼의 사포닌성분은 인삼의 주요 생리활성물질 중의 하나로서 다양한 약리효능과 생리활성이 밝혀져 인삼 품질평가의 지표성분으로 활용되고 있다(Hwang and Oh, 1984; Joo and Kwak, 1988).

산삼배양근, 압출성형 산삼배양근, 홍삼의 조사포닌 함량은 Table 11에 나타내었다. 조사포닌 함량은 산삼배양근 7.99%, 110℃ 압출성형 산삼배양근 8.40%, 120℃ 압출성형 산삼배양근이 9.60%로 측정되어, 압출성형을 하였을 때 조사포닌 함량은 증가를 하였으며, 배럴온도가 증가함에 따라 조사포닌 함량의 증가량도 커졌다. Jee등(2006)의 연구결과에 따르면 수분함량 25%, 배럴온도 155℃에서 압출성형한 인삼미삼의 조사포닌 함량이 72%까지 증가하였다. 이러한 결과와 비교하였을 때 본 연구에서도 압출성형을 통하여 산삼배양근의 조사포닌 함량이 증가함을 확인 할 수 있었다.

Table 11. Content of crude saponin and antioxidant compounds of various ginseng samples

Ginseng samples	Barrel temp.(℃)	Crude saponin (%)	Acidic polysaccharide (㎍/g)	Polyphenolic compound (㎍/g)
Tissue cultured mountain ginseng	-	7.99±0.77	0.24±0.01	85.22±2.22
Extruded tissue cultured mountain ginseng	110	8.40±0.55	0.63±0.02	41.63±1.50
	120	9.60±0.22	0.75±0.03	38.95±1.96
Red ginseng	-	5.75±0.97	0.83±0.02	104.85±4.09

이는 압출성형기 내부를 통과할 때 열에너지와 기계적 에너지에 의한 전단력과 압력을 받아 사포닌의 전환량이 증가된 것으로 판단되었다. 산삼배양근에 비교하여 홍삼의 사포닌 함량이 낮은 이유는 주근 함량이 높은 홍삼과 비교하였을 때 산삼배양근은 사포닌함량이 높은 미세근으로 구성되었기 때문으로 사료된다.

홍삼, 산삼배양근, 압출성형 산삼배양근의 산성다당체와 총페놀성화합물의 함량은 Table 11과 같다. 각 시료의 산성다당체 함량은 홍삼 0.83 ㎍/g, 산삼배양근 0.24 ㎍/g, 110℃ 압출성형 산삼배양근 0.63 ㎍/g, 120℃ 압출성형 산삼배양근이 0.75 ㎍/g로 측정되었다. 산성다당체는 인삼의 부위별로는 미삼보다는 주근(동체부위)이 높다고 알려져 있다(Okuda, 1972). 홍삼의 경우 산성다당체가 가장 높게 나타난 이유는 이와 같이 주근함량이 높기 때문이다. 본 실험에서 압출성형의 산삼배양근의 산성다당체 함량의 증가는 압출성형 공정에 의한 조직파괴로 인해 용출이 용이해지고, 세포벽과 같은 조직이 변화된 것이라는 Ha와 Ryu(2005)의 연구결과와 일치하였다. 또한 산성다당체는 배럴온도가 증가함에 따라 증가하는 것으로 확인되었다.

페놀성화화합물은 단백질 등의 거대분자들과 결합하는 성질뿐만 아니라 이러한 성질은 미생물 세포와 작용하여 성장저해를 유발하는 항미생물효과와 항산화 작용에 의한 항암효과가 제안되고 있으며 Pb, Cd과 같은 유해 중금속을 제거시키는 효과뿐만 아니라 항산화 효과 등의 생리활성 기능도 가지며 식물체에 특수한 항산화 효과 이외에도 항 피로효과 및 노화억제에 관련된 효능들이 많이 보고되어 있다(Kuhnau, 1976). 페놀성화합물의 함량은 산삼배양근이 85.22 ㎍/g이었고, 압출성형을 하였을 때 배럴온도 110℃에서 41.63 ㎍/g, 120℃에서 38.95 ㎍/g로 측정되었다. 본 결과에서는 페놀성화합물은 압출성형을 하였을 때 50%가량 감소하였으며, 배럴온도의 증가에 따라 감소량 역시 증가하였다. 홍삼의 경우 104.85 ㎍/g로 각 시료 중에서 가장 높은 것으로 확인되었다.

다. 진세노사이드 함량

인삼시료의 종류에 따른 진세노사이드 함량은 홍삼에서는 Rb2, Rd, Rg3, CK가 확인되었으며, 백삼과 산삼배양근에서는 Rd와 CK만 확인되었다(Table 12). 압출성형 산삼배양근에서는 Rd, CK 외에도 홍삼 특유의 사포닌이라고 알려진 Rg3가 확인되어 압출성형을 통하여 산삼배양근의 홍삼화가 가능한 것으로 확인되었다. 진세노사이드 CK는 사람의 장내 박테리아에 의해 진세노사이드 Rb1, Rb2 와 Rc가 compound K(IH-901)로 불리는20-*O*-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol로 변형된 것을 말한다. CK는 발효 또는 압출성형공정에 의해 생성될 수 있다고 알려져 있으나, 백삼과 산삼배양근에 비하여 홍삼, 압출성형 산삼배양근이 낮게 나타났다. 이것은 홍삼이나 압출성형 산삼배양근의 제조공정 중에서 CK가 손실 또는 다른 형태의 진세노사이드로 변형된 것으로 판단된다.

Table 12. Contents of ginsenoside components in ginseng samples.

Ginseng samples	Rb2	Rd	Rg3	CK	Rh2
A	-	5.677	-	17.717	-
B	4.657	9.656	15.531	41.39	-
C	-	7.555	-	13.213	-
D	-	11.734	4.666	11.293	-
E	-	9.569	3.912	8.014	-

A : White ginseng

B : Red ginseng

C : Tissue cultured mountain ginseng

D : Extruded tissue cultured mountain ginseng
(moisture content: 25%, barrel temperature: 110℃, screw speed: 200 rpm)

E : Extruded tissue cultured mountain ginseng
(moisture content: 25%, barrel temperature: 120℃, screw speed: 200 rpm)

라. 압출성형 산삼배양근의 항산화 물질 변화

말톨은 일반적으로 수삼이나 백삼에는 함유되지 않고, 홍삼에서만 확인되는 물질로 알려져 있으며 항산화 효과 및 노화 억제 효과가 있다고 밝혀진 비사포닌계 화합물이다(Han et al., 1992). 박층크로마토그래피를 이용한 말톨의 정성분석 결과는 Fig. 16과 같고 본 실험에 사용된 홍삼에서는 말톨이 확인되었으나, 산삼배양근을 비롯한 110℃와 120℃에서 압출성형한 산삼배양근에서는 말톨을 확인할 수 없었다. Ha 등(2004)은 수삼을 압출성형하였을 때 모든 처리구에서 말톨 성분을 확인할 수 있었지만, 본 실험에서는 이와 다른 결과를 나타내었다.

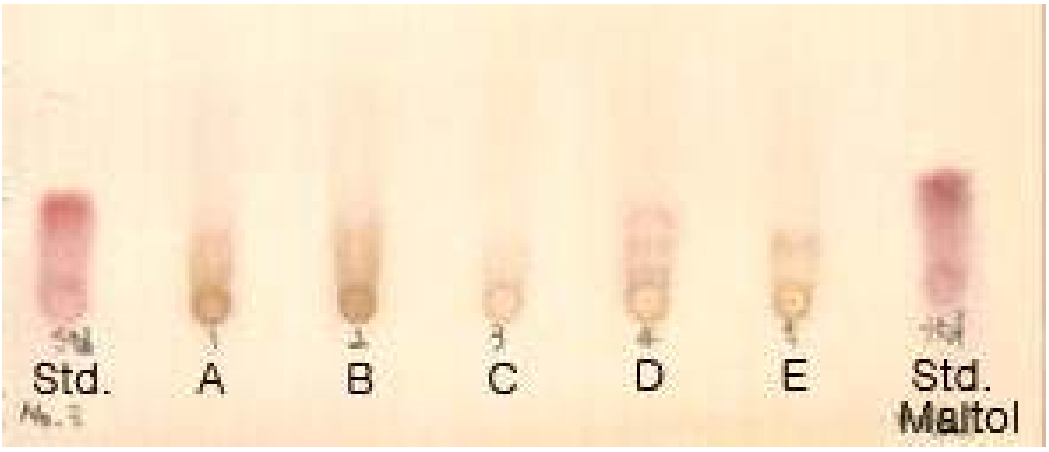


Fig. 16. Thin-layer chromatography of maltol from ginseng samples.

A: Extruded tissue cultured mountain ginseng at 110℃

B: Extruded tissue cultured mountain ginseng at 120℃

C: White ginseng

D: Red ginseng

E: Tissue cultured mountain ginseng

마. 압출성형 산삼배양근의 갈색도, 적색도와 침출특성

홍삼, 산삼배양근, 압출성형 배양근의 갈색도(browness)와 적색도(redness)는 Table 13과 같다. 갈색도와 적색도는 홍삼이 가장 낮았으며(browness: 0.548, redness: 0.128), 산삼배양근(browness: 0.786, redness: 0.184)을 압출성형하였을때 증가하는 경향을 나타내었다.

갈색도와 적색도의 증가량은 배럴온도가 증가함에 따라 켜졌고, 배럴온도 120℃에서 갈색도가 2.204, 적색도가 0.523까지 증가함을 확인할 수 있었다. 배럴온도는 압출성형에서 갈변에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 볼 수 있다(Sahagun and Harper, 1980). Kim 과 Ryu(2005) 역시 수삼을 압출성형하였을 때 갈색도와 적색도가 증가한다는 연구결과를 발표하여 본 실험에서의 결과와 유사함을 확인하였다.

Table 13. Browness and redness of various ginseng samples

Ginseng samples	Barrel temp. (℃)	Browness (420nm)	Redness (520nm)
Tissue cultured mountain ginseng	-	0.786	0.184
Extruded tissue cultured mountain ginseng	110	2.061	0.483
	120	2.204	0.523
Red ginseng	-	0.548	0.128

각 인삼시료의 침출패턴을 Fig. 17에 나타내었다. 인삼시료의 침출량은 초기 10분 동안 급격히 증가하였으며, 홍삼이 가장 낮게 나타났다. 산삼배양근을 압출성형하였을때 초기 10분에서 침출액의 갈색도는 2배 이상 증가하였으며, 최종침출시간 50분에서는 2.5배 이상 증가하였다. 이러한 결과는 Kim과 Ryu(2005)의 연구결과에서도 유사하게 확인되었는데 이러한 이유는 압출성형을 통한 수용성지수의 증가에 따른 용출량 증가로 판단된다.

인삼시료의 침출패턴에서 초기 7분 동안 갈색도 변화량과 1차 반응속도 속도식으로 부터 구한 초기 침출속도는 Fig. 18에 나타냈으며, 그에 따른 침출속도상수(release rate constant) k는 Table 5와 같다. 홍삼의 침출속도상수는 0.0672 min^{-1}로 가장 낮았으며, 산삼배양근이 0.1006 min^{-1}, 110℃ 압출성형 산삼배양근이 0.1292 min^{-1}, 120℃ 압출성형 산삼배양근이 0.1373 min^{-1}의 순서로 나타났다. 본 실험에서는 압출성형을 통하여 산삼배양근의 침출속도를 증가시킬 수 있었고, 배럴온도의 증가에 따라 침출속도가 증가함을 확인할 수 있었다. 압출성형 산삼배양근의 경우 팽화에 의한 기공이 형성과 전단력에 의한 세포벽의 파괴가 압출성형물 내부의 유효성분의 침출율 향상에 영향을 미친 것으로 판단된다.

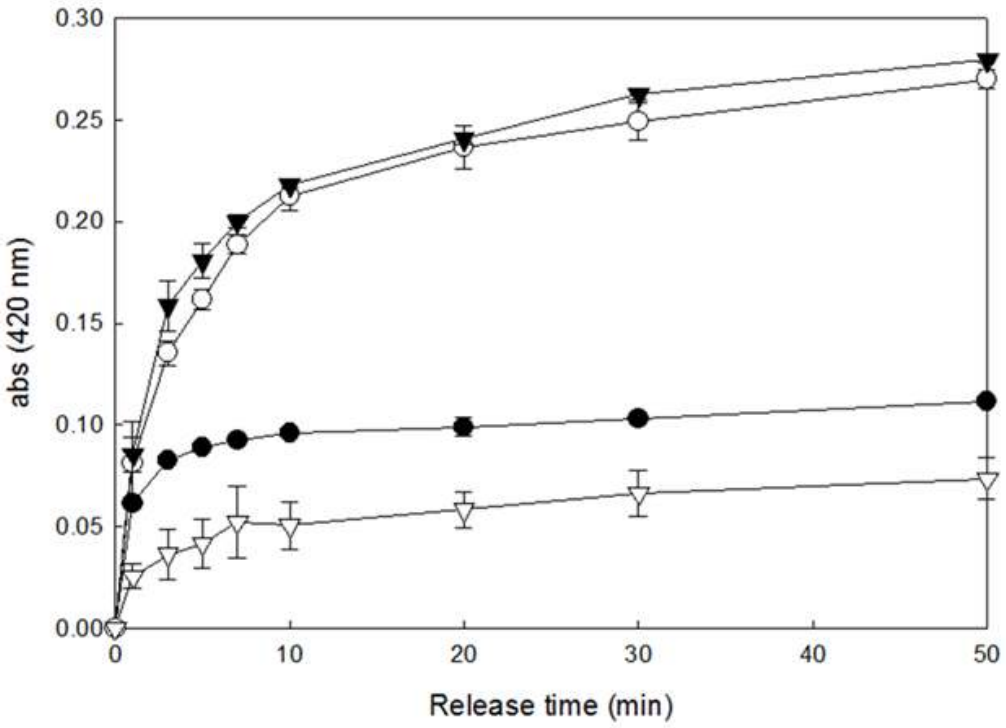


Fig. 17. Release pattern of ginseng samples at 420 nm

▽: Red ginseng

●: Tissue cultured mountain ginseng

○: Extruded tissue cultured mountain ginseng at 110℃

▼: Extruded tissue cultured mountain ginseng at 120℃

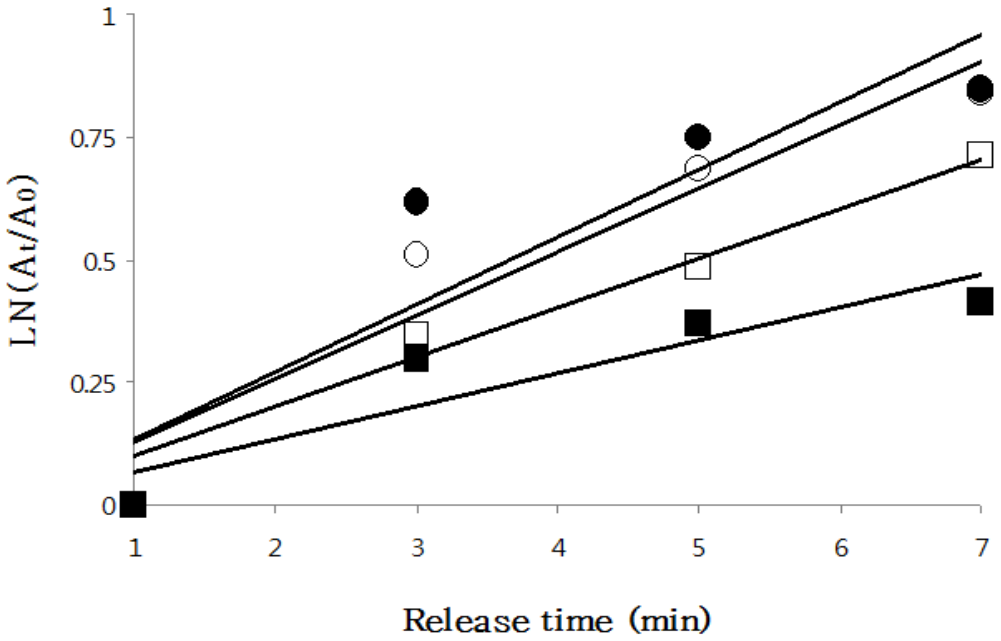


Fig. 18. Release pattern of ginseng samples at 420 nm

■: Tissue cultured mountain ginseng(y=0.1006x, R^2=0.9527)

○: Extruded tissue cultured mountain ginseng at 110℃(y=0.1292x, R^2=0.9075)

●: Extruded tissue cultured mountain ginseng at 120℃(y=0.1373x, R^2=0.9098)

□: Red ginseng(y=0.0672x, R^2=0.8225)

Table 14. Release rate constant of browness in ginseng samples

Ginseng samples	Barrel temp. (℃)	Release rate constant of browness(min^{-1})
Tissue cultured mountain ginseng	–	0.1006
Extruded tissue cultured mountain ginseng	110	0.1292
	120	0.1373
Red ginseng	–	0.0672

2. 압출성형 공정변수에 따른 산삼배양근, 백삼 및 홍삼 미삼의 물리화학적 특성 비교

가. 일반성분 비교

각 인삼의 일반성분은 Table 15에 나타내었다. 산삼배양근과 백삼 미삼의 조회분 함량, 조단백질 함량은 압출성형공정을 하였을 때 변화하지 않았다. 조지방 함량은 압출성형을 하였을 때 감소하였다. 조지방의 함량은 압출성형 공정변수 중 온도와 수분함량에 따라 변화 하였는데, 온도가 낮을수록 수분함량이 낮을수록 조지방의 함량이 낮았다. 백삼 미삼의 조지방의 함량은 산삼배양근 보다 더 많은 손실률을 나타내었다. 압출성형을 통하여 조지방 함량이 감소하는 것은 압출성형공정에서 투입되는 열과 수분, 압력 등의 작용들이 지방의 산패 등의 변화를 일으켰기 때문으로 판단된다.

Table 15. General compositions of various ginseng.

Samples	Moisture content (%)	Crude ash (%)	Crude fat (%)	Crude protein (%)
MG	5.70	8.52	0.98	23.24
MG1	9.18	8.41	0.55	23.01
MG2	8.09	8.56	0.71	22.95
MG3	10.53	8.34	0.74	22.81
MG4	10.24	8.47	0.75	22.77
WG	4.83	5.14	1.21	13.10
WG1	6.91	5.22	0.17	12.99
WG2	6.69	5.50	0.2	13.03
WG3	7.13	5.20	0.25	12.80
WG4	7.75	5.09	0.35	12.79
RG	7.57	5.00	0.9	12.89

MG: Tissue cultured mountain ginseng MG1-MG4: Tissue cultured mountain ginseng extruded at 25% moisture and 110℃ die temperature (MG1), at 25% moisture and 140℃ (MG2), at 35% moisture and 110℃(MG3), and at 35% moisture and 140℃ (MG4), WG: Root hair of white ginseng, WG1-4: same conditions as MG1-4, RG: Root hair of red ginseng.

각 인삼시료의 총당의 함량은 홍삼 미삼이 가장 높게 측정되었고, 원료 백삼 미삼과 산삼배양근의 총당 함량은 백삼 미삼이 더 높게 측정되었으며, 압출성형 백삼 미삼이 압출성형 산삼배양근 보다 총당 함량이 전체적으로 높게 측정되었다(Fig. 19).

압출성형공정을 통하여 백삼 미삼의 경우 미세하게 증가하였는데, 이는 압출성형 과정에서 투입되는 전단력 등에 의한 물리적인 작용이 인삼의 세포벽을 파괴하여 당류 성분의 용출이 증가된 것으로 판단된다. 하지만 총당 함량의 변화에서 배럴온도와 수분함량에 따른 영향은 확인할 수 없었다.

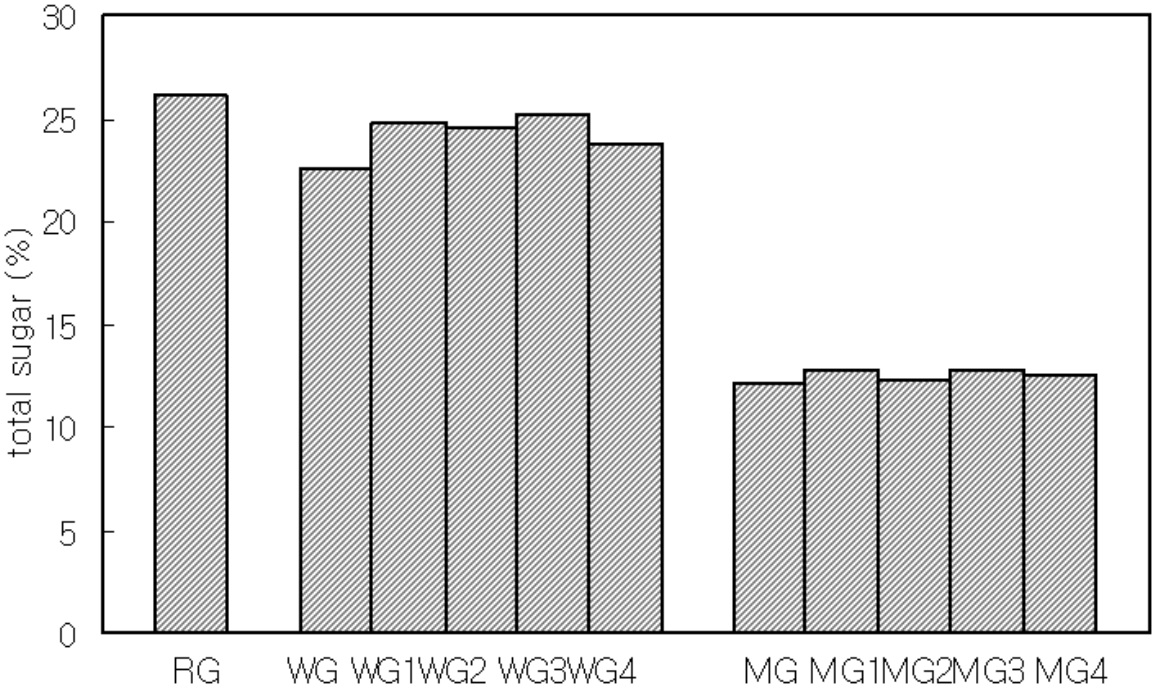


Fig. 19. Total sugar content of various ginsengs.
Samples are the same as in Table 15.

압출성형공정변수에 따른 각 인삼시료의 환원당 함량은 Fig. 20와 같다. 홍삼 미삼의 경우 각 원료 백삼 미삼과 산삼배양근 보다 2배 이상 많은 환원당 함량이 측정되었다. 백삼 미삼과 산삼배양근의 경우 압출성형을 통하여 환원당 함량이 감소하였다.

백삼 미삼의 경우 배럴온도 110℃, 수분함량 25%의 압출성형 조건에서 환원당 함량이 가장 많이 감소하였고, 산삼배양근의 경우에는 배럴온도 140℃, 수분함량 35%를 제외한 조건에서 환원당 함량의 감소가 크게 나타났다.

전체적으로 배럴온도와 수분함량이 증가할수록 환원당 함량은 감소하였다. 이러한 환원당 함량의 감소는 압출성형 과정에서 투입되는 기계적 에너지에 의한 작용으로 환원당의 환원기와 아미노산의 아미노기가 결합하여 발생하는 갈변에 의한 감소로 판단되어진다.

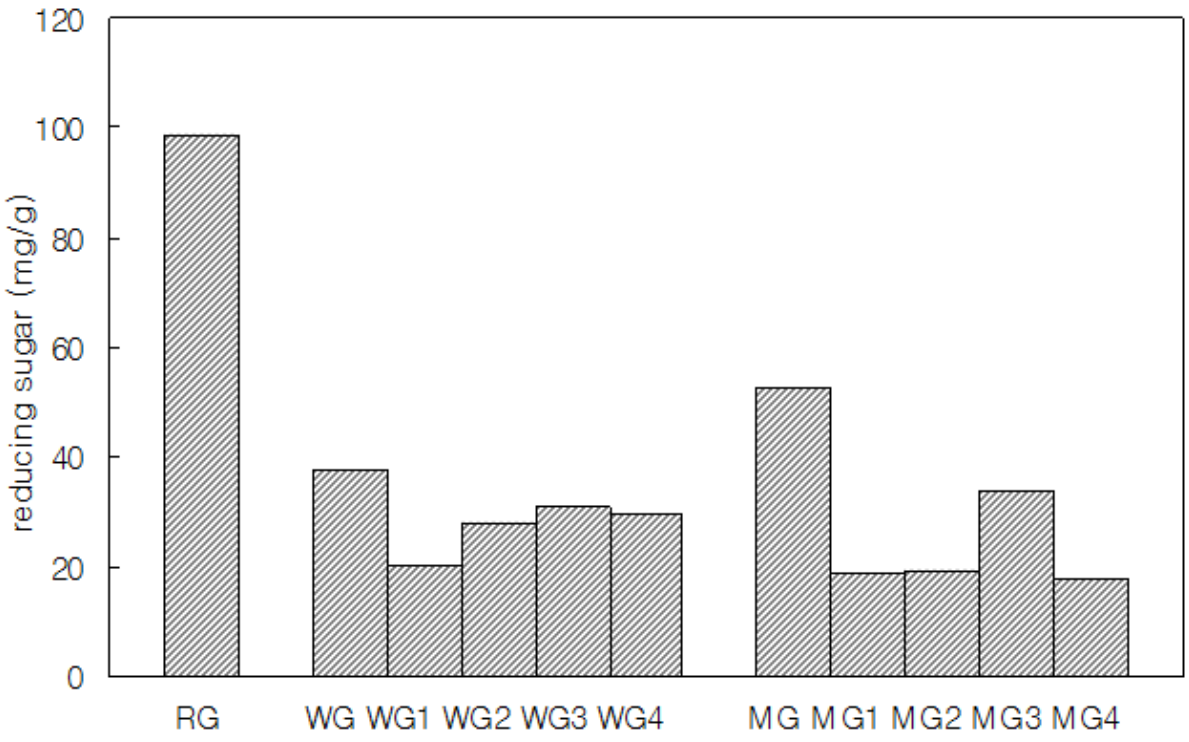


Fig. 20. Reducing sugar content of various ginsengs.
Samples are the same as in Table 15.

나. 유효성분 비교

조사포닌은 인삼의 대표적인 유효물질로 알려져 있으며, 그 약리효능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 각 인삼시료의 조사포닌 함량은 Fig. 21과 같다. 조사포닌 함량은 홍삼이 가장 낮았으며, 원료 백삼 미삼과 산삼배양근은 큰 차이가 없었다. 압출성형 공정을 통하여 조사포닌 함량은 백삼 미삼, 산삼배양근 모두 증가하였으며, 조사포닌 함량의 증가량은 백삼 미삼이 산삼배양근보다 더 크게 측정되었다. 백삼 미삼의 경우 수분함량이 낮을 경우 조사포닌 함량의 증가량이 컸으며, 산삼배양근의 경우 배럴온도 110℃에서 증가량이 크게 나타났다.

압출성형공정 중에 원료인삼이 배럴내부를 통과 할 때, 높은 열과 기계적 에너지의 투입으로 발생한 전단력과 고압으로 인해 사포닌의 변화가 일어난 것으로 판단된다. 결론적으로 조사포닌 함량은 압출성형공정을 통하여 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

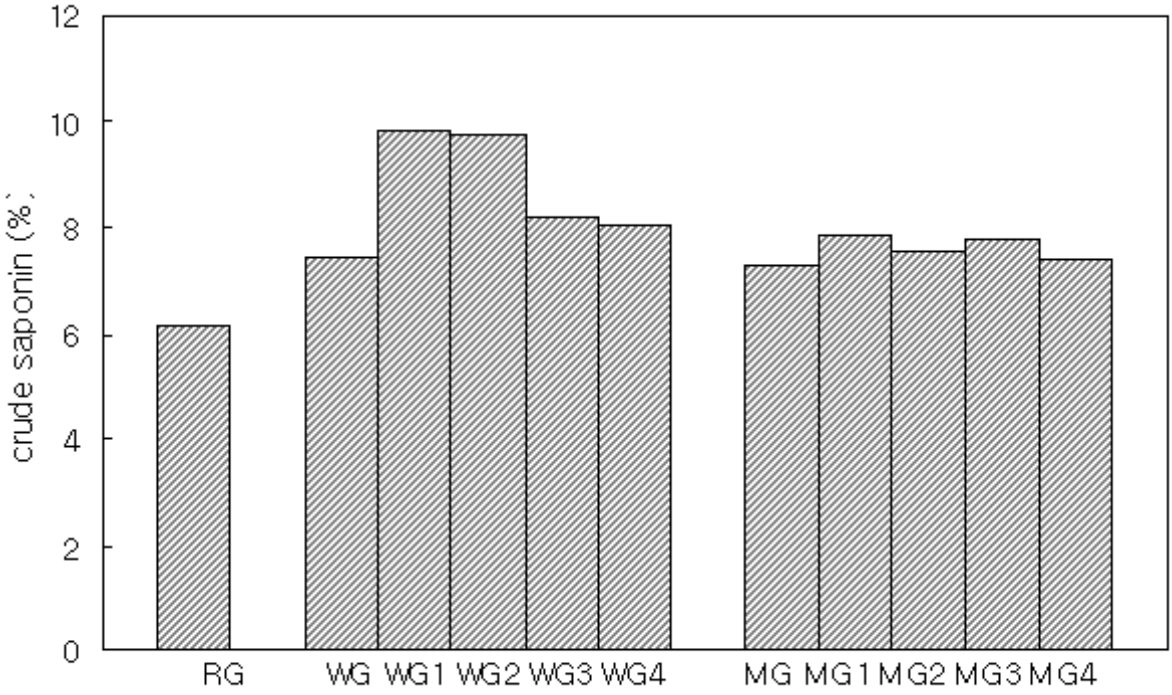


Fig. 21. Crude saponin content of various ginsengs.
Samples are the same as in Table 15.

산성다당체는 galacturonic acid, glucuronic acid, mannuronic acid 등의 산성당이 다량 함유된 분자량 15,000 이상의 다당체를 말한다. 중성다당체에 비해 면역체계에 미치는 영향이 크다고 알려진 산성다당체는 독소의 작용을 억제하는 약리작용이 있으며, 비만 또는 고지혈증의 예방에도 유효성이 있는 것으로 보고되고 있다. 인삼의 크기별로는 미삼보다는 주근 (동체부위)이 높다고 알려져 있다. 본 연구에서는 산성다당체 함량은 홍삼이 가장 크게 나타났으며, 원료 산삼배양근이 가장 낮게 나타났다(Fig. 22).

인삼을 압출성형을 하였을 때 산성다당체 함량은 배럴온도 140℃, 수분함량 35% 압출성형 백삼 미삼이 가장 많이 증가한 것으로 측정 되었으며, 나머지 시료에서는 큰 변화가 나타내지 않았다. 압출성형을 하였을 때 일부 시료에서 산성다당체의 함량이 미세하게 증가하는 것을 확인할 수 있었지만, 압출성형 공정변수에 따른 산성다당체 함량 변화는 확인할 수 없었다.

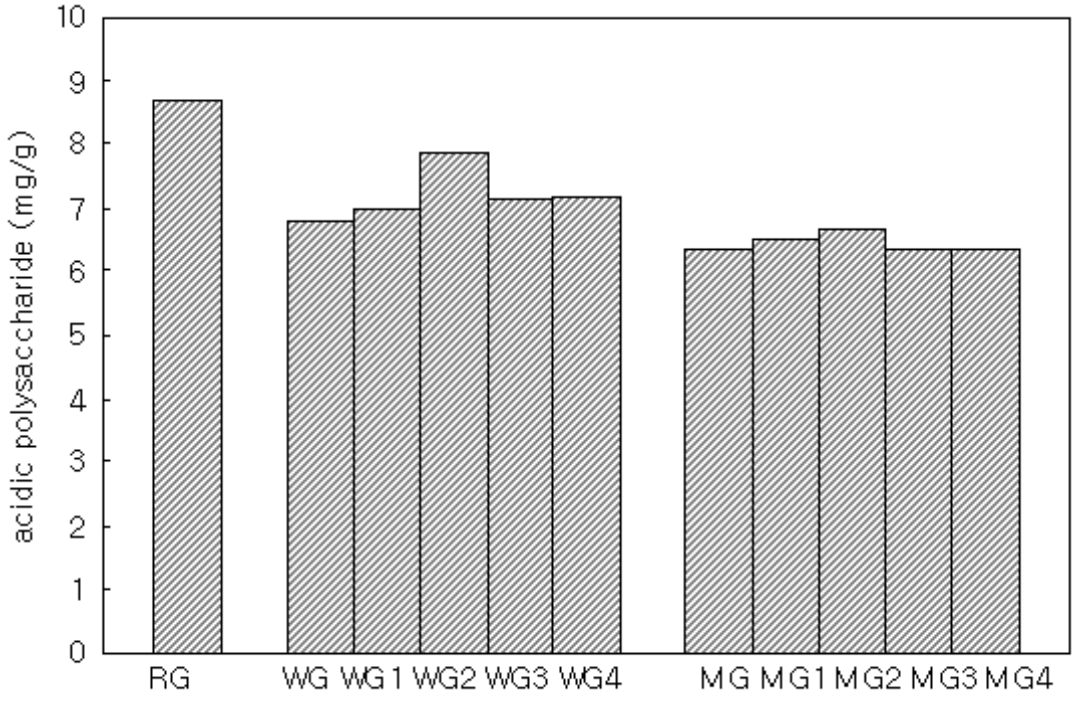


Fig. 22. Acidic polysaccharide content of various ginsengs.
Samples are the same as in Table 15.

폴리페놀성분은 단백질 등의 거대분자들과 결합하는 성질뿐만 아니라 미생물 세포와 작용하여 성장저해를 유발시킴으로써 항미생물 효과를 나타내주고 항산화 작용에 의한 항암효과가 제안되고 있으며 Pb나 Cd과 같은 유해 중금속을 제거시키는 효과뿐만 아니라 항산화 효과 등의 생리활성 기능도 가지며 식물체에 특수한 항산화 효과 이외에도 항 피로효과 및 노화억제에 관련된 효능들이 많이 밝혀진 것으로 보고되고 있다. 각 인삼 시료의 폴리페놀함량은 Fig. 23에 나타내었다. 홍삼 미삼과 원료 백삼 미삼과 비교하였을 때 원료 산삼배양근의 폴리페놀함량이 월등히 높게 측정되었다. 압출성형을 하였을 때 폴리페놀함량은 급격히 감소하였으며, 감소량은 산삼배양근이 백삼 미삼보다 더 큰 것으로 확인되었다. 원료 백삼 미삼과 비교하였을 때 홍삼 미삼의 폴리페놀함량이 더 낮게 측정된 것을 확인하였을 때 폴리페놀성분은 압출성형공정에서 투입되는 열과 수분에 의해 영향을 받으며, 감소하는 것으로 판단되었다. 폴리페놀성분 감소에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 수분함량으로 확인되었으며, 수분함량이 낮을수록 폴리페놀함량의 감소가 크게 나타났다.

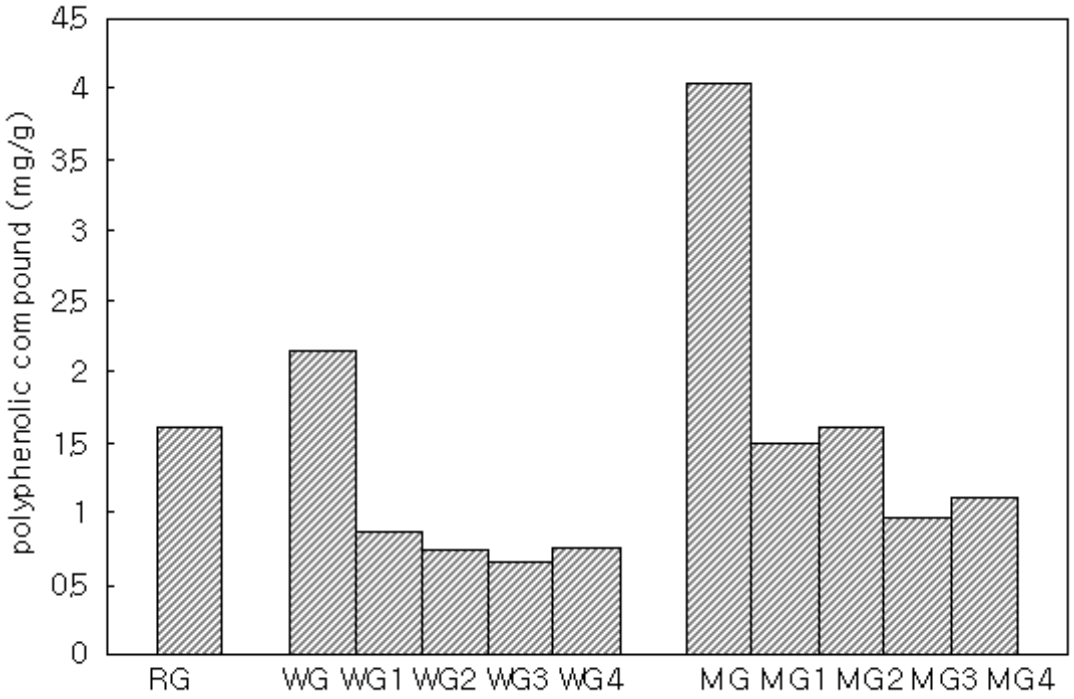


Fig. 23. Polyphenolic compound content of various ginsengs.
Samples are the same as in Table 15.

3. 압출성형 산삼배양근과 백삼의 발효특성 비교

가. pH

발효 시간에 따른 pH의 변화는 Fig. 24에 나타내었다. 발효 시작 한지 1일 후 압출성형 산삼배양근의 pH는 5.38로 측정되었고, 압출성형 백삼은 4.87로 측정되었다. 발효시작 후 2일까지 압출성형 산삼배양근 발효액 pH는 4.59 범위로 급격히 낮아졌으며, 이후 발효 6일까지는 완만히 감소하다가 마지막 7일날 pH가 4.50에서 3.99로 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 반면, 압출성형 백삼 발효액 pH는 발효기간 동안 계속 낮아졌고 마지막 7일날 3.43으로 측정되었다. Min과 Cho의 연구결과에서 발효 인삼주의 pH가 3.8~4.2로 보고된 결과와 비교하였을 때, 압출성형 산삼배양근 발효액과 백삼 발효액은 유사한 결과를 나타내었다.

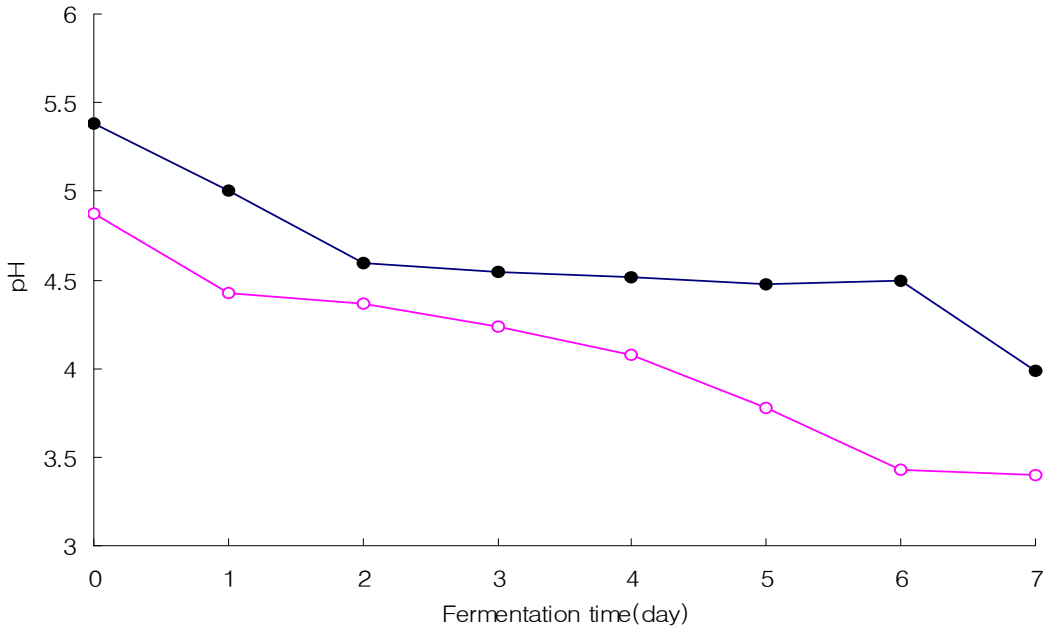


Fig. 24. Changes in pH of ginseng fermentation product during fermentation at 27℃.
−●− extruded tissue cultured mountain ginseng.
−○− extruded white ginseng.

나. 당도

발효 시간에 따른 당도의 변화는 Fig. 25과 같다. 발효 전 현탁액의 당도는 압출성형 산삼배양근이 9.3%, 압출성형 백삼이 12.2%로 측정되었다. 발효액의 당도 변화는 발효 시작 후 24시간까지 급격히 낮아졌으며 그 이후부터는 완만하게 낮아지면서 안정된 수치를 보여주었다. 이는 산삼배양근을 첨가한 발효주의 당도가 발효시간에 따라 낮아지는 것과 유사한 결과를 나타내었지만 당도가 감소하는 시간이 20일 동안 계속된 것과 비교하여 본 연구에서는 발효 1일 만에 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과는 발효시작 시 효모만을 접종한 연구와는 달리 누룩을 혼합하여 첨가에 의해 당류의 전환이 빨리 일어나 알코올 전환율이 증가한 것으로 판단되었다.

압출성형 산삼배양근 발효액은 발효 마지막 7일날 7.4%로 가장 낮았으며, 압출성형 백삼 발효액은 발효 4일날 최저당도인 7.4%로 측정되었다. 이후에 큰 변화는 생기지 않았다.

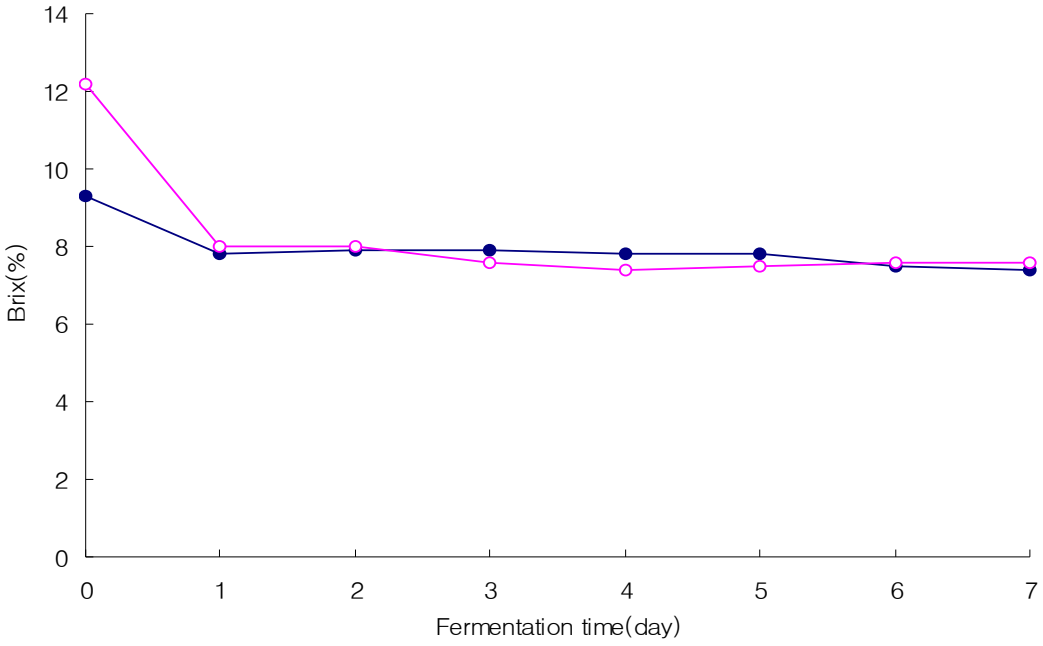


Fig. 25. Changes in brix of ginseng fermentation product during fermentation at 27℃. Samples are the same as in Fig. 24.

—●— extruded tissue cultured mountain ginseng.

—○— extruded white ginseng.

다. 산도

발효 시간에 따른 산도의 변화는 Fig. 26에 나타내었다. 최종 압출성형 산삼배양근 발효액 산도는 0.88%이고, 압출성형 백삼 발효액의 산도는 1.71%로 측정되었다. 압출성형 산삼배양근 발효액은 발효초기 1일 동안 가장 많이 증가하고 이후 완만하게 증가하였지만, 발효 4일날 0.62%로 감소하였다가 5일날 0.7%로 다소 증가하였고 마지막 7일날 0.88%로 증가하는 양상을 보였다. 압출성형 백삼 발효액은 발효초기 2일 동안 가장 많이 증가하였고, 압출성형 산삼배양근 발효액의 산도는 비교적 낮게 측정되었다.

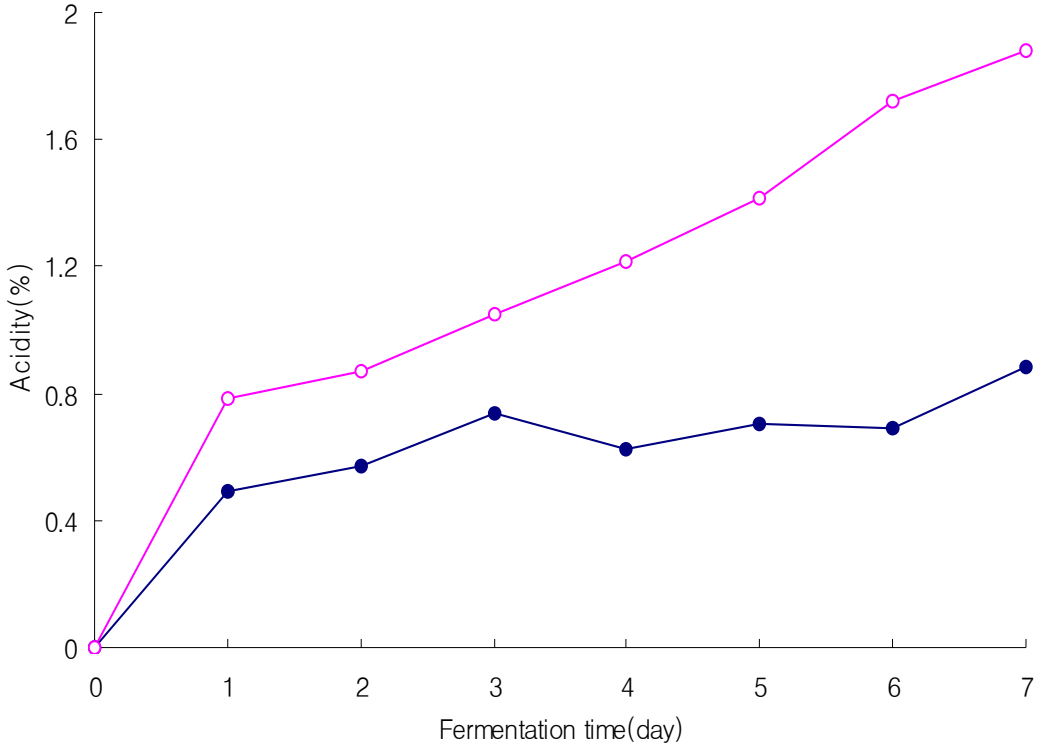


Fig. 26. Changes in acidity of ginseng fermentation product during fermentation at 27℃. Samples are the same as in Fig. 24.

−●− extruded tissue cultured mountain ginseng.

−○− extruded white ginseng.

라. 알코올 함량

알코올 함량은 압출성형 산삼배양근 발효액과 백삼 발효액이 발효 2일까지 급격한 증가를 보였고, 발효시간 2일 이후에는 백삼 발효액은 큰 변화가 없는 반면에 산삼배양근 발효액은 발효시간 3일 이후 일정 범위에서 증감을 나타내었다. 발효시간에 따른 알코올의 변화는 Fig. 27과 같다. 발효 기간 중 발효액의 최대 알코올 함량은 압출성형 산삼배양근 발효액이 발효 2일날 0.73%, 압출성형 백삼 발효액이 발효 6일날 5.03%로 측정되었다. 발효시간 7일에서 최종 발효액의 알코올 함량은 압출성형 산삼배양근 발효액이 0.57%로 측정되었고, 압출성형 백삼 발효액이 5.03%로 측정되었다. 본 연구에서의 알코올 함량은 비교적 낮게 측정되었는데, 이는 산삼배양근이 백삼에 비해 알코올 발효의 기질이 되는 전분의 양이 적기 때문에 액화 당화가 느리고 수율이 낮은 것으로 판단되었다.

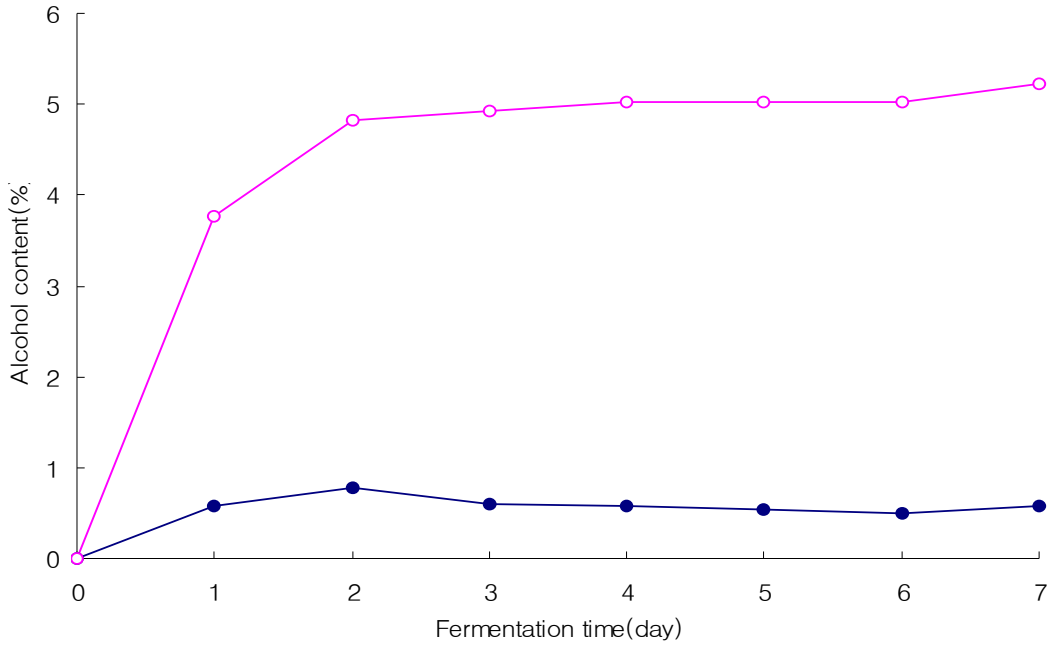


Fig. 27. Changes in alcohol content of ginseng product during fermentation at 27℃. Samples are the same as in Fig. 24.

4. 압출성형 산삼배양근, 백삼 및 홍삼 미삼의 발효특성

가. pH 및 산도

발효과정에서 생성되는 유기산, 탄산가스 및 기타 산 물질은 pH에 영향을 미친다(Kim et al., 2007). 발효액의 발효시간에 따른 pH의 변화는 Fig. 28과 같다.

pH는 발효 시작 시 홍삼이 4.87±0.00, 산삼배양근이 5.62±0.00, 산삼배양근 압출성형물이 5.15±0.00~5.51±0.00의 범위로 압출성형물 중에서 MG2(배럴온도 140℃, 수분함량 25%)가 가장 높게 측정되었으며, MG3(배럴온도 110℃, 수분함량 35%)가 가장 낮게 측정되었다. 발효시작 후 pH는 발효 시작 후 2일까지 크게 낮아졌으며, 이후 15일까지 완만하게

감소하여 안정된 상태를 나타내었다. 산삼배양근 압출성형물에서 MG2(배럴온도 140℃, 수분함량 25%)가 감소폭이 가장 크게 나타났으며(5.51±0.00～4.28±0.00), MG3(배럴온도 110℃, 수분함량 35%)가 5.15±0.00～4.20±0.00으로 가장 적은 감소폭을 나타내었다. 발효 15일에서의 pH는 홍삼이 4.13±0.00, 산삼배양근이 4.06±0.00, 산삼배양근 압출성형물이 4.20±0.00～4.28±0.00로 압출성형 공정 간에 큰 차이는 없었다. Min과 Cho(1994)의 연구결과에서 발효 인삼주의 pH가 3.8～4.2로 보고된 결과와 비교하였을 때, 본 연구에서도 유사한 결과를 나타내었다.

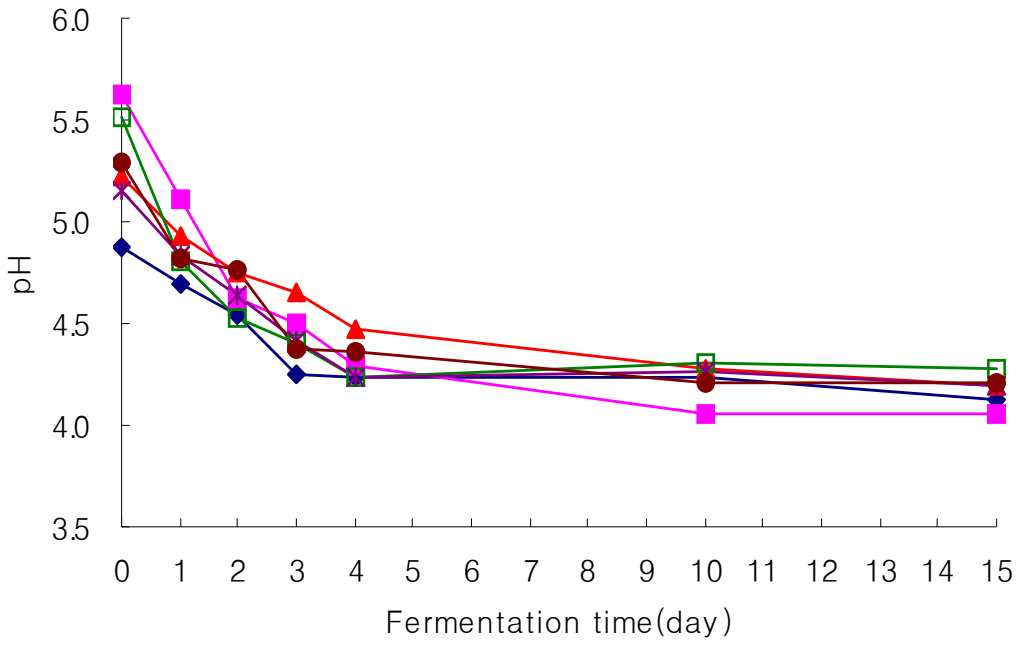


Fig. 28. Changes in pH of tissue cultured mountain ginseng fermentation product during fermentation at 27℃.

-◆- Root hair of red ginseng

-■- Tissue cultured mountain ginseng

-▲- Extruded tissue cultured mountain ginseng (barrel temperature 110℃, moisture content 25%)

-□- Extruded tissue cultured mountain ginseng (barrel temperature 140℃, moisture content 25%)

-Ж- Extruded tissue cultured mountain ginseng (barrel temperature 110℃, moisture content 35%)

-●-Extruded tissue cultured mountain ginseng (barrel temperature 140℃, moisture content 35%)

발효시간에 따른 발효액의 산도 변화는 Fig. 29와 같다. 최종 인삼발효액 산도는 홍삼이 1.12±0.06%, 산삼배양근이 1.19±0.06%, 산삼배양근 압출성형물이 0.97±0.01~1.02±0.01%로 측정되어 압출성형 공정 간의 산도에 대한 차이는 나타나지 않았다. Han 등(2007)의 연구결과에서 압출성형백삼의 산도는 20일 이후부터 크게 증가하였다고 하였을 때, 본 연구에서 압출성형 공정 간의 산도가 크게 차이를 보이지 않은 이유는 발효시간이 상대적으로 짧아 각종 미생물에 의한 유기산 생성이 활발하게 일어나지 않은 것으로 사료된다. 산도의 증가는 발효기간 동안 계속하여 증가하였고, 발효 초기 2일 동안 가장 많이 증가하였다. pH의 감소에 따라 산도는 증가하였는데 4일 이후의 산도의 증가와 비교하여 pH의 변화가 나타나지 않은 것은 발효기간 중에 생성되는 아미노산 등에 의한 완충작용으로 인하여 pH의 범위가 안정한 것으로 판단되었다(Jang and Yu, 2007).

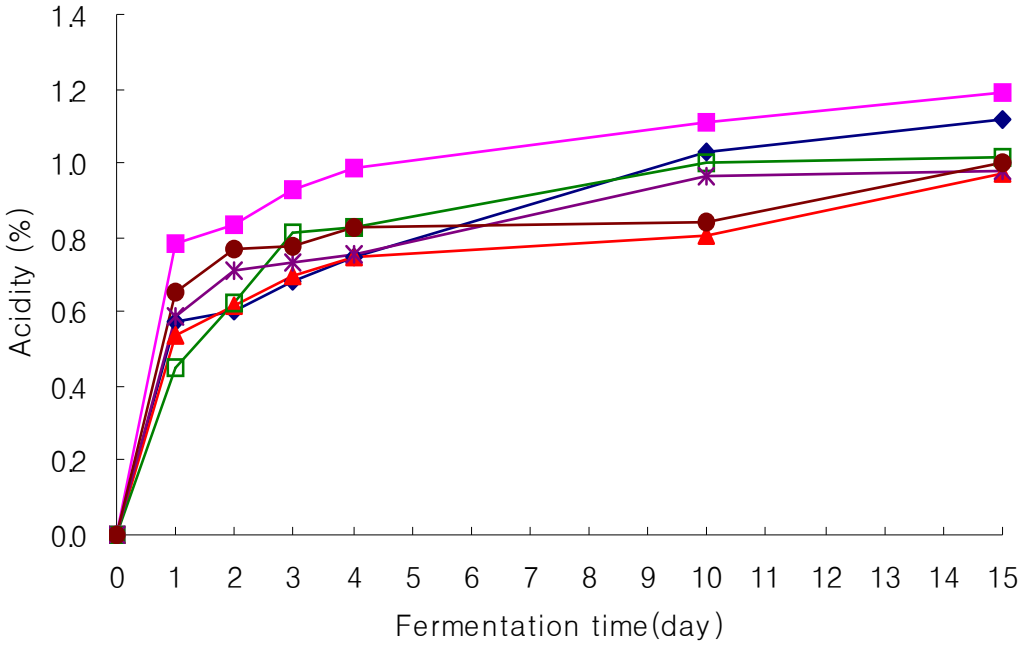


Fig. 29. Changes in acidity of tissue cultured mountain ginseng fermentation product during fermentation at 27℃.
Samples are the same as in Fig. 28.

나. 당도

발효 시간에 따른 당도의 변화는 Fig. 30과 같다. 발효 전 인삼발효액의 당도는 홍삼 11.6±0.00 °Brix, 산삼배양근 8.3±0.00 °Brix, 산삼배양근 압출성형물 9.8~10.0±0.00 °Brix로 홍삼이 가장 높게 측정되었다. 산삼배양근을 압출성형 하였을 때 현탁액의 당도는 최대 10.0±0.00 °Brix(배럴온도 110℃, 수분함량 35%)까지 증가하였다. 발효액의 당도는 발효 초기 2일 동안 급격하게 감소하였고 이후 완만하게 감소하여 안정된 수치를 보여주었다.

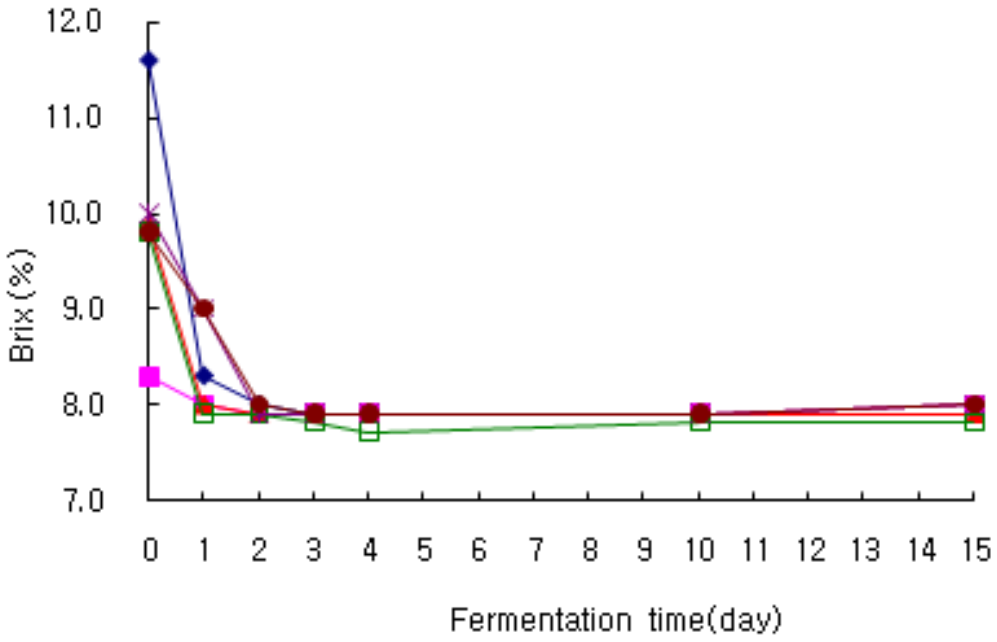


Fig. 30. Changes in °Brix of tissue cultured mountain ginseng fermentation product during fermentation at 27℃.
Samples are the same as in Fig. 28.

이는 Jung 등(2005)이 산삼배양근을 첨가한 발효주의 당도가 발효시간에 따라 낮아지는 것과 유사한 결과를 나타내었지만 당도가 감소하는 시간이 20일 동안 계속된 것과 비교하여 본 연구에서는 발효 2일 만에 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과는 발효시작 시 효모만을 접종한 Jung 등(2005)의 연구와는 달리 누룩을 혼합하여 첨가에 의해 당류의 전환이 빨리 일어나 알코올 전환율이 증가한 것으로 판단되었다.

최저 당도는 발효 10~15일에 나타났으며, 홍삼이 7.9±0.00 °Brix, 산삼배양근 8.0±0.00 °Brix, 산삼배양근 압출성형물이 7.8~8.0±0.00 °Brix로 홍삼이 가장 낮게 측정되었다.

다. 총당

발효시간에 따른 총당의 변화는 Fig. 31에 나타내었다. 발효 전 현탁액의 총당 함량은 홍삼 133.92±6.81 mg/mL, 산삼배양근 49.68±0.71 mg/mL, 산삼배양근 압출성형물 79.23±4.17~84.25±1.10 mg/mL로 측정되었다. 압출성형물에서는 MG2(배럴온도 140℃, 수분함량 25%)가 84.25±1.10 mg/mL로 총당 함량이 가장 높게 측정되었고, MG1(배럴온도 110℃, 수분함량 25%)가 79.23±4.17 mg/mL로 가장 낮게 측정되었다. 산삼배양근이 압출성형공정을 통하여 최고 70% 증가함을 확인 할 수 있었다.

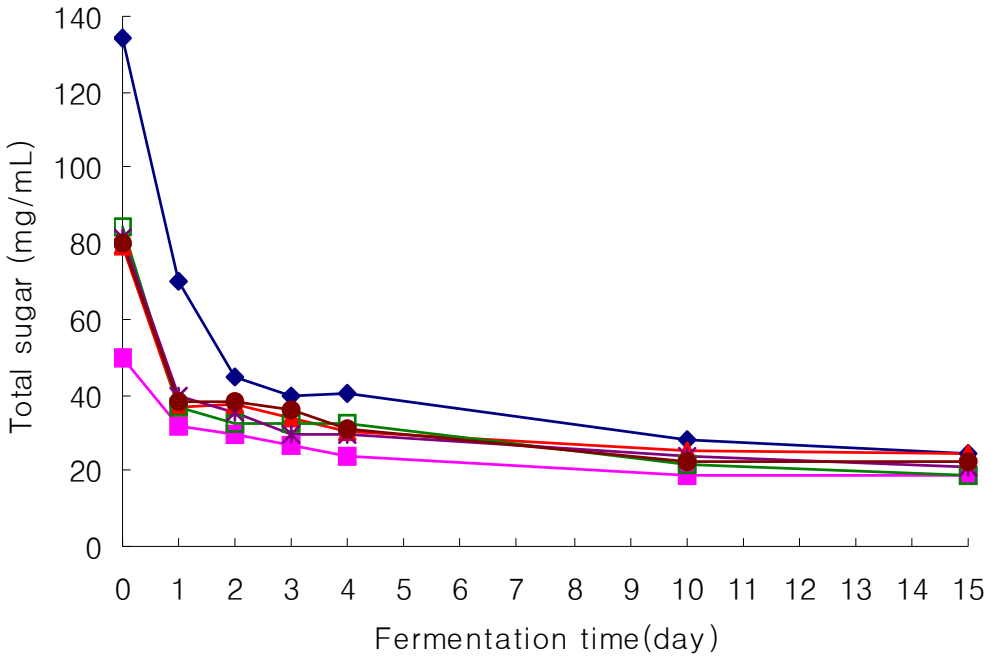


Fig. 31. Changes in total sugar of tissue cultured mountain ginseng fermentation product during fermentation at 27℃.
Samples are the same as in Fig. 28.

Kim 등(2007)은 팽화미분을 첨가한 탁주 양조 제조에서 팽화미분의 첨가량이 증가할수록 총당의 함량이 높아졌다고 보고하였는데 본 연구에서도 압출성형물의 경우 고온 · 고압에서 압출성형 하여 팽화가 일어났기 때문에 압출성형현탁액의 총당 함량이 높은 것으로 사료된다. 또한, 발효 초기에 총당의 함량이 급격히 감소하였다는 보고와도 동일한 결과임을 확인 할 수 있었다.

발효액의 총당 함량 변화는 발효 2일까지 급격히 감소하다가 발효 15일 까지 완만하게 감소하는 패턴을 나타내었다. 이러한 결과는 당도의 감소 패턴과도 유사하였다. 최종 발효액의 총당 함량은 홍삼이 24.34±1.51 mg/mL, 산삼배양근이 18.61±0.47 mg/mL로 측정되었고, 산삼배양근 압출성형물에서는 MG1(배럴온도 110℃, 수분함량 25%)가 24.23±0.40 mg/mL로 가장 높게 측정되었으며, MG2(배럴온도 140℃, 수분함량 25%)가 19.09±4.03 mg/mL로 가장 낮게 측정되어 MG2(배럴온도 140℃, 수분함량 25%)가 가장 발효 적성이 좋은 것으로 판명되었다.

라. 환원당

발효 전 현탁액의 환원당 함량은 홍삼이 53.12±1.42 mg/mL, 산삼배양근이 11.23±0.22 mg/mL, 압출성형산삼배양근이 21.67±0.58～25.96±0.55 mg/mL로 측정되었다(Fig. 32). 압출성형물에서는 MG2(배럴온도 140℃, 수분함량 25%)가 25.96±0.55 mg/mL로 가장 높게

측정되었고, MG1(배럴온도 110℃, 수분함량 25%)이 21.67±0.58 mg/mL로 가장 낮게 측정되었다. 산삼배양근과 산삼배양근 압출성형물을 비교하였을 때 산삼배양근은 압출성형공정을 통해서 2배 정도의 환원당 함량이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 압출성형공정을 통해 인삼 전분의 호화와 함께 전분의 사슬이 절단되어 환원당 함량이 증가한다는 Ha와 Ryu(2005)의 연구와 유사한 결과였다. 발효액의 환원당은 발효 2일까지 급격히 감소하였고, 이후 발효 종료 시까지 서서히 감소하는 양상을 나타내었다. 이러한 양상은 당도와 총당의 패턴과도 유사하였다.

환원당의 감소량은 홍삼 발효액이 43.00±0.29 mg/mL로 가장 컸으며, 산삼배양근 발효액의 경우 발효 초기 환원당 함량의 감소량이 7.00±0.48 mg/mL로 가장 낮게 측정 되었는데 이는 초기 환원당 농도가 낮기 때문인 것으로 판단되었다. 압출성형물에서는 MG2(배럴온도 140℃, 수분함량 25%)가 24.00±0.39 mg/mL 감소되어 가장 많은 환원당을 소모하는 것으로 확인되었다. 최종 환원당의 함량은 홍삼 발효액이 9.83±0.01 mg/mL, 산삼배양근 발효액이 0.41±0.02 mg/mL, 산삼배양근 압출성형물이 1.57±0.34～2.17±0.12 mg/mL로 측정되었다.

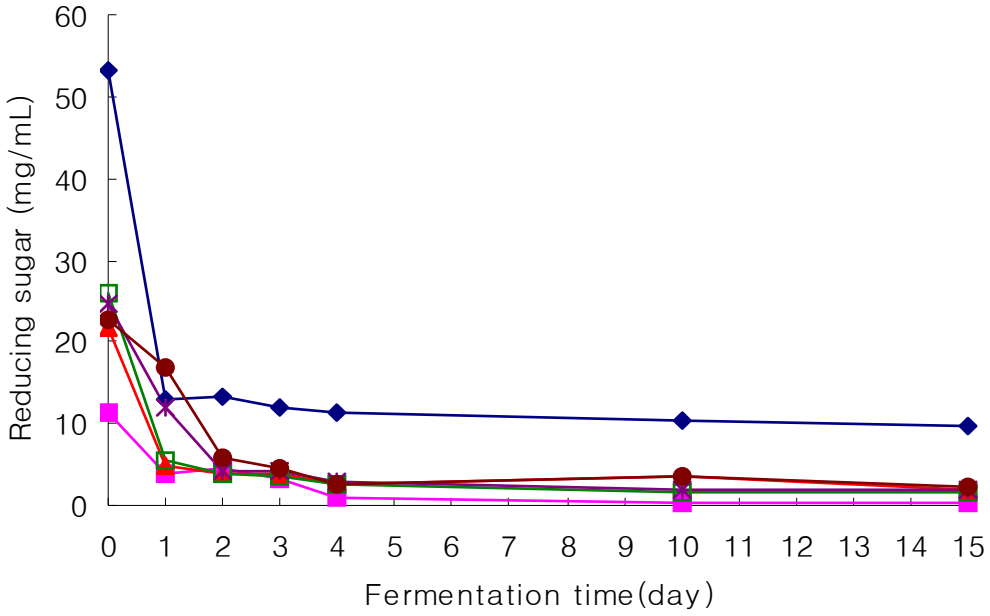


Fig. 32. Changes in reducing sugar of tissue cultured mountain ginseng fermentation product during fermentation at 27℃.
Samples are the same as in Fig. 28.

마. 알코올 함량

인삼 발효액의 알코올 함량은 발효 초기 4일까지 꾸준한 증가를 보이다가 이후 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다(Fig 33). 반면, 산삼배양근을 제외한 산삼배양근 압출성형

물, 홍삼 발효액에서는 발효 10일 이후에 알코올 함량이 약간 감소하는 결과를 나타내었는데 이는 장기간의 발효기간 중 알코올의 부분적인 휘발로 인해 이러한 결과가 나타나는 것으로 판단되었다.

인삼발효액의 최대 알코올 함량은 홍삼 3.82±0.10%, 산삼배양근 0.91±0.06%, 산삼배양근 압출성형물 1.86±0.10~2.28±0.06%로 측정되었다. 압출성형물에서는 MG2(배럴온도 110℃, 수분함량 25%)가 2.28±0.06%로 가장 높게 측정되었다. 산삼배양근은 압출성형을 통해 알코올 함량이 2~3배로 증가하였는데 이로써 산삼배양근을 압출성형 함으로써, 발효 효율을 높일 수 있음이 확인되었다. Moon 등(1998)은 고온 · 고압 압출성형 공정을 통하여 알코올 발효를 하였을 때 비처리구에 비하여 18% 이상 알코올 수율이 증가하였다고 보고하였는데 본 연구결과에서도 유사한 결과가 확인되었다.

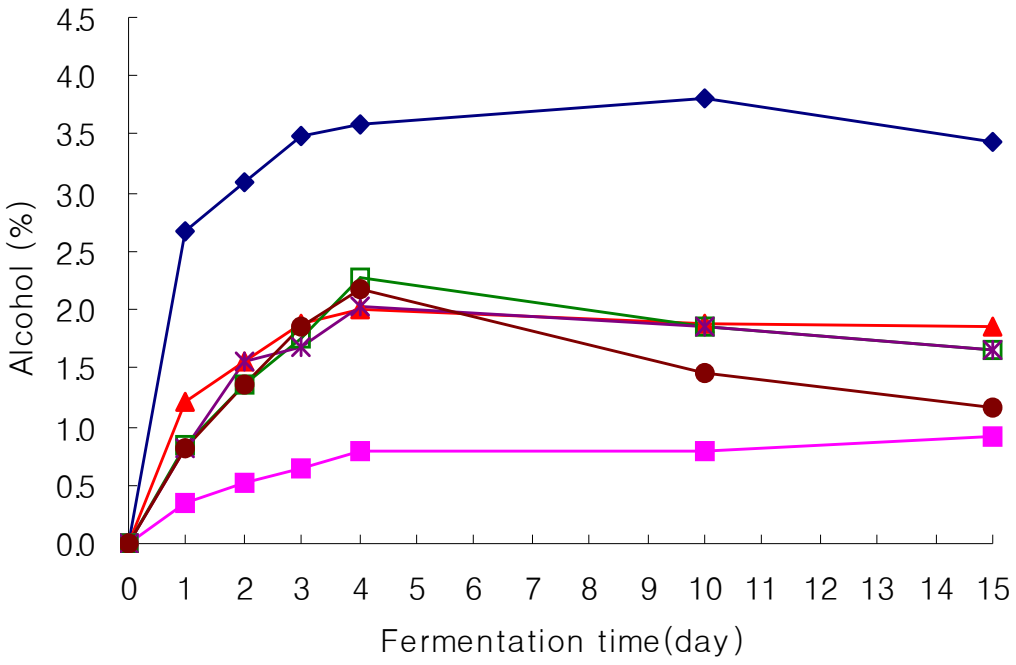


Fig. 33. Changes in alcohol of tissue cultured mountain ginseng fermentation product during fermentation at 27℃.
Samples are the same as in Fig. 28.

본 연구에서 산삼배양근이 홍삼에 비해 알코올 함량이 비교적 낮게 측정되었는데, 이는 산삼배양근이 홍삼에 비해 알코올 발효의 기질이 되는 전분의 양이 적기 때문에 액화 당화가 느리고 수율이 낮은 것으로 판단되었다. 발효가 진행될수록 알코올이 생성됨에 따라 당은 점점 줄어드는데 본 연구에서도 알코올이 생성됨에 따라 당도, 총당, 환원당이 감소하는 패턴을 나타내었다.

5. 압출성형 산삼배양근 발효액의 항산화 활성

가. DPPH에 의한 전자공여능

발효액의 DPPH에 의한 전자공여능은 Fig. 34에 나타내었다. DPPH에 의한 전자공여능은 식물과 과일 추출물, 식품 원료 등에 있는 순수한 산화방지 성분과 산화방지 활성의 경향을 위해 널리 이용된다(Shih et al., 2006). 각종 야채와 과일에 있는 총 페놀성 화합물과 DPPH에 의한 전자공여능 사이에 가까운 상호관계가 있다고 보고되고 있다(Robards et al., 1999; Pyo et al., 2004). 또한, Kim 등(2008)은 인삼의 DPPH에 의한 전자공여능이 총 페놀성 화합물과 관계가 있다고 보고하였다.

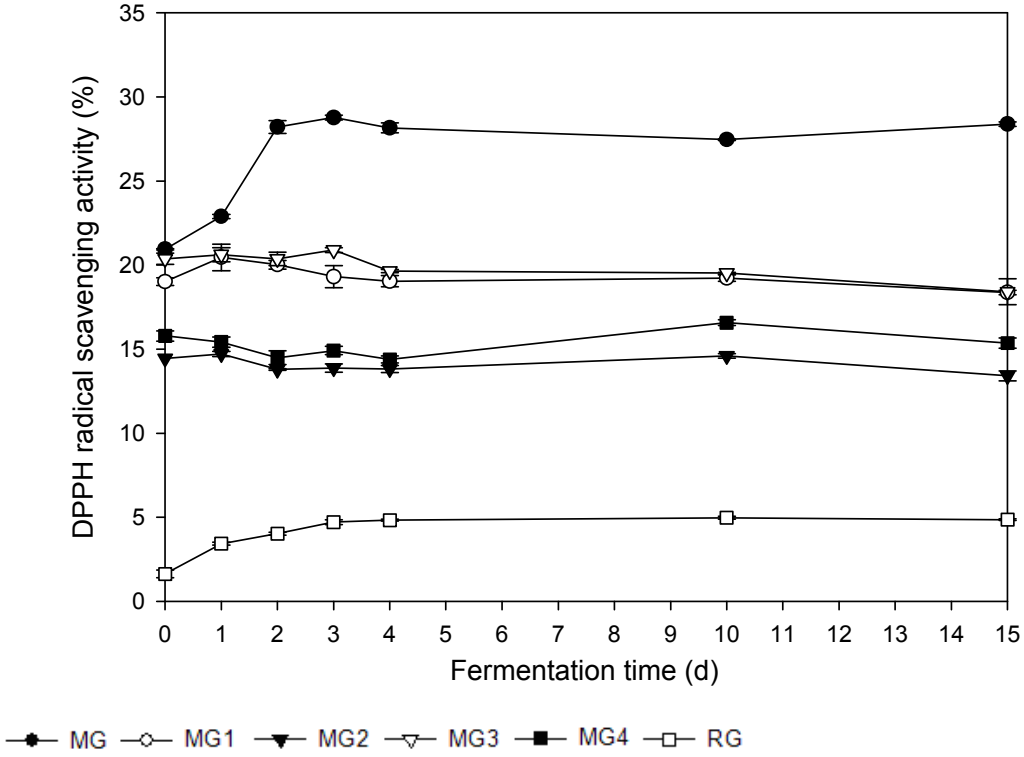


Fig. 34. DPPH radical scavenging activity during fermentation.

RG: Root hair of red ginseng

MG: Root hair of tissue cultured mountain ginseng

MG1: Extruded by root hair of tissue cultured mountain ginseng (MG) (moisture content: 25%, barrel temperature: 110℃)

MG2: Extruded by root hair of tissue cultured mountain ginseng (MG) (moisture content: 25%, barrel temperature: 140℃)

MG3: Extruded by root hair of tissue cultured mountain ginseng (MG) (moisture content: 35%, barrel temperature: 110℃)

MG4: Extruded by root hair of tissue cultured mountain ginseng (MG) (moisture content: 35%, barrel temperature: 140℃)

본 연구에서는 발효가 진행되는 동안 시료간의 유의적인 차이는 찾을 수 없었다. 그러나 산삼배양근과 홍삼의 DPPH에 의한 전자공여능 활성은 발효시작 후 4일까지 꾸준히 증가하였고, 발효가 끝날 때까지 줄어들지 않고 안정적으로 남아있었다. 발효시간에 따른 DPPH에 의한 전자공여능 활성 결과는 산삼배양근>압출성형산삼배양근>홍삼의 순으로 나타났다. 이 결과는 DPPH에 의한 전자공여능 활성이 압출성형 후에 줄어들고 홍삼 보다는 산삼배양근에서 현저하게 높았다는 것을 나타내었다. 게다가 MG1(19.01%)과 MG3(20.37%)가 MG2(14.45%)와 MG4(15.78%)보다 발효 첫째 날에 높게 측정되었다.

이것으로 보아 DPPH에 의한 전자공여능 활성은 압출성형 온도의 증가와 수분 함유량으로 줄었다는 것을 확인 할 수 있었다. 압출성형 온도가 수분 함유량 보다는 효력이 더 있는 것으로 나타났으며 DPPH에 의한 전자공여능은 총 페놀성 화합물의 결과와 유사한 추세를 보여주었다.

나. 총 페놀성 화합물

발효액의 총 페놀성 화합물의 변화는 Fig. 35와 같다. 총 페놀성 화합물은 발효시간에 따라 유의적인 변화를 보이지 않았다. 발효 시작 후 2일까지는 경미하게 증가하였고 2일 이후부터는 느리게 줄어드는 패턴을 나타내었다. 홍삼보다는 산삼배양근이 더 높게 측정되었고, 압출성형 산삼배양근은 산삼배양근 보다 적게 측정되었다. 압출성형 온도가 높을수록 총 페놀성 화합물은 적게 측정되었다.

페놀 물질들은 환경에 의한 식물의 상호작용에 의해 생산되는 2차 대사산물로 식물체 내에 함유되어 있는 페놀성 화합물은 각종 라디칼에 대한 소거작용이 있으며, 페놀성 화합물 함량과 정의 상관관계가 있다는 사실들이 보고되면서 페놀성 화합물의 함량이 천연물을 이용한 추출물이 갖는 잠재적인 항산화성을 검증하는 일차적인 실험 자료로 사용되고 있다(Jayabalan et al., 2008; Randhir et al., 2004). 실제로, 사과에는 폴리페놀류, 펙틴, 플라보노이드 등의 항산화물질이 많이 함유되어 있다.

하지만 본 연구에서의 결과는 보고된 다른 인삼 결과에 있는 총 페놀성 화합물 변화와는 일관되지 않는다. 이 문제는 다른 물질에 의해 다르게 기인 할 수도 있다고 추측되었다.

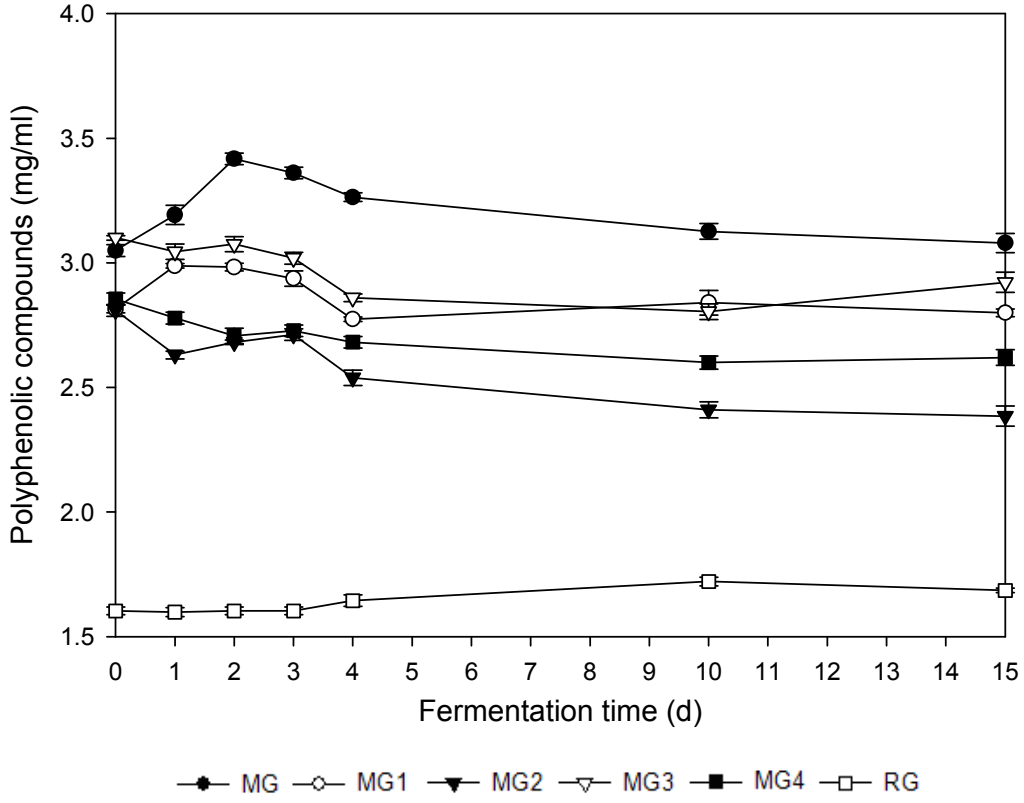


Fig. 35. The content of polyphenolic compounds during fermentation.
Samples are the same as in Fig. 34.

다. 산성다당체

발효 첫째 날 산성다당체의 함량은 현저하게 줄어들었으며, 이후에 발효 시작 후 4일까지 꾸준히 줄어들었다(Fig. 36). 4일 이후부터는 변화가 나타나지 않았고, 산성다당체의 함량은 압출성형 산성다당체와 홍삼이 산성다당체보다 높게 측정되었다. 발효 첫째 날 산성다당체 함량은 홍삼 8.30 mg/mL, 산삼배양근 4.59 mg/mL, 압출성형 산삼배양근이 6.75~7.67 mg/mL로 측정되었고, 발효 마지막 날에는 홍삼 4.67 mg/mL, 산삼배양근 4.14 mg/mL, 압출성형 산삼배양근이 4.05~5.23 mg/mL로 측정되었다. 시료간의 산성다당체 함량은 발효 첫째 날에는 각각 달랐으나 발효 마지막 날에는 비슷하게 측정되었다. 6개 견본에 있는 신랄한 다당류의 내용은 발효작용의 첫번째 날에 달랐다, 그러나 마지막 일에, 그들은 동일한 수준에 있었다. 이로써 산성다당체가 압출성형에 의해 증가함을 확인할 수 있었다. 인삼 다당체 성분은 체지방 분해작용과 암환자의 식욕감퇴 및 체중감소를 일으키는 독소호르몬(toxohormone-L)에 대해 길항적 작용을 나타낸다(Belogortseva et al., 2000; Woo et al., 2001; Lee et al., 2004) 또한 산성다당체 성분은 항암 면역증강효과를 가지고 있다는 것이 밝혀지고 있다(Lee et al., 2004). 본 연구에서 산성다당체의 증가를 위해 압출성형공정을 제외한 다른 발효 조건을 고려해보는 것이 좋을 것으로 사료된다.

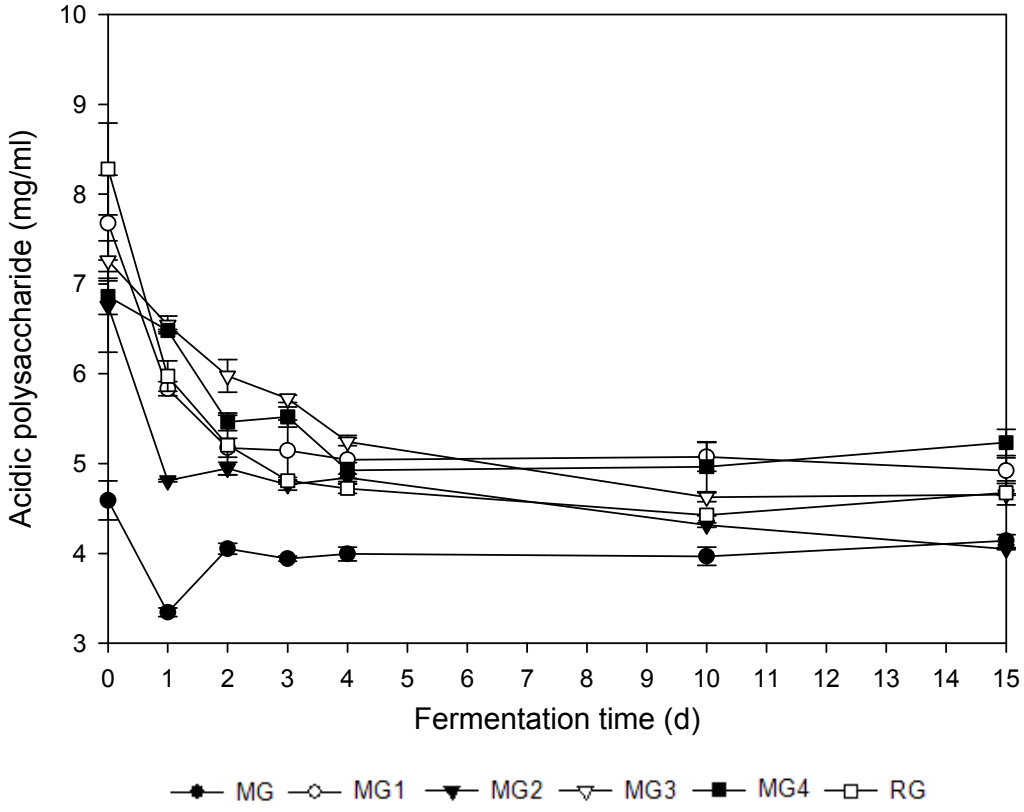


Fig. 36. The content of acidic polysaccharide during fermentation.
Samples are the same as in Fig. 34.

라. 조사포닌

사포닌은 인삼의 주요 약효성분으로 알려져 있어 인삼의 성분적 품질평가의 지표가 된다. 발효시간에 따른 조사포닌의 변화는 Fig. 37에 나타내었다. 산삼배양근을 제외한 홍삼과 압출성형 산삼배양근은 발효 후에 조사포닌의 함량은 줄었으며 발효 첫째 날 조사포닌의 함량은 홍삼 11.27 mg/mL, 산삼배양근 10.64 mg/mL, 압출성형 산삼배양근이 10.27~11.56 mg/mL로 측정되었다. 산삼배양근을 압출성형 한 후 MG4를 제외하고는 산삼배양근보다 증가하는 경향을 나타내었고, 발효 15일 후의 조사포닌의 함량은 산삼배양근이 가장 높게 증가하는 경향을 나타내었다(홍삼 9.90 mg/mL, 산삼배양근 14.41 mg/mL, 압출성형 산삼배양근 9.59~10.28 mg/mL).

이는 조사포닌의 함량이 압출성형 과정 동안에 수분 함유량 및 배럴온도에 영향을 받지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 인삼은 압출성형기 내부를 통과할 때 열에너지와 기계적 에너지에 의한 전단력과 압력을 받아 압출성형 하는 과정 동안에 생성된다(Dickinson and Stainsby, 1982; Prentice, 1984; Bourne, 1982; Sherman, 1979). Ha 등(2005) 역시 압출성형공정을 하는 동안 조사포닌의 함량이 증가하였다고 보고하였다.

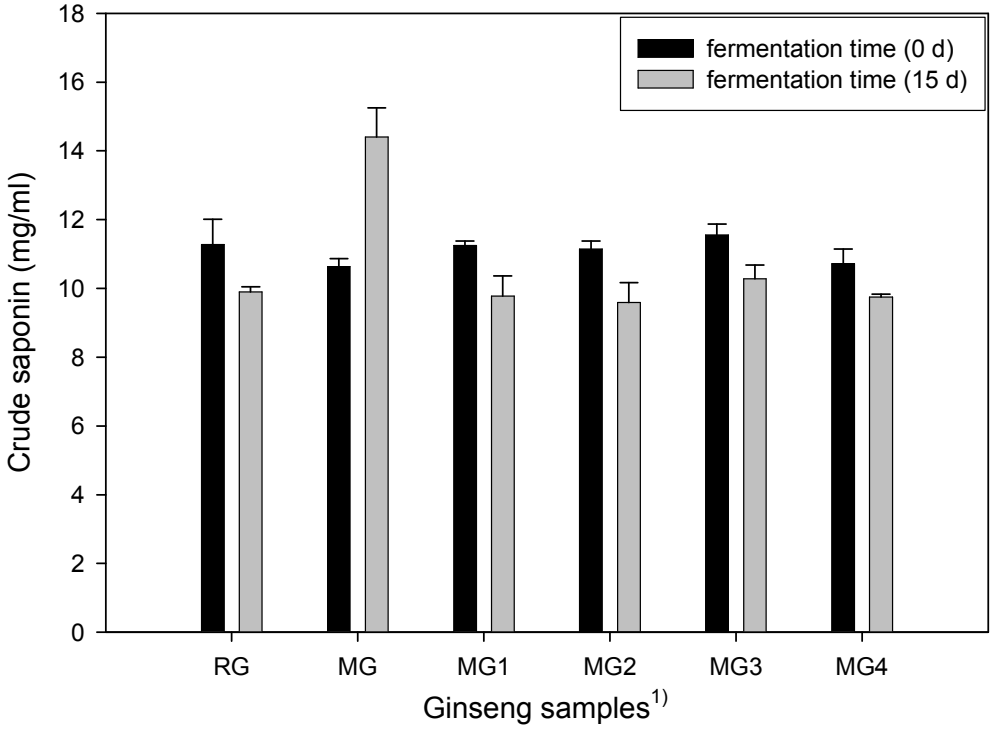


Fig. 37. The content of crude saponin in fermentation solution.

6. 백삼, 홍삼 및 압출성형 산삼농축액의 항산화 활성 및 항균활성

가. 총페놀성 화합물

Polyphenolic compounds 측정 결과는 Fig. 38에 나타내었다. 같은 용매를 사용한 홍삼과 백삼 추출물 보다 산삼배양근과 압출성형 산삼배양근 추출물의 poliphenol compounds가 높게 측정되었으며 오차범위가 $P<0.05$로 유의적인 결과를 나타냈다. 모든 시료는 95% ethanol 추출물의 Polyphenolic compounds가 높게 측정됐으며 수분함량 25% 압출성형 산삼배양근(29.03 μg GAE/mg), 수분함량 35% 압출성형 산삼배양근(28.70 μg GAE/mg), 산삼배양근(28.01 μg GAE/mg) 순으로 높게 측정되었고 가장 낮은 함량은 물로 추출한 홍삼(6.02 μg GAE/mg)으로 측정되었다. 비록 물 추출물의 poliphenol compounds가 낮게 측정되었지만 산삼배양근의 poliphenol compounds는 19.66 μg GAE/mg로 다른 시료의 물 추출물보다 높은 함유량을 나타내었다. 또한 Fig. 1에서와 같이 압출성형 후 polyphenol contents의 증가를 확인 할 수 있다.

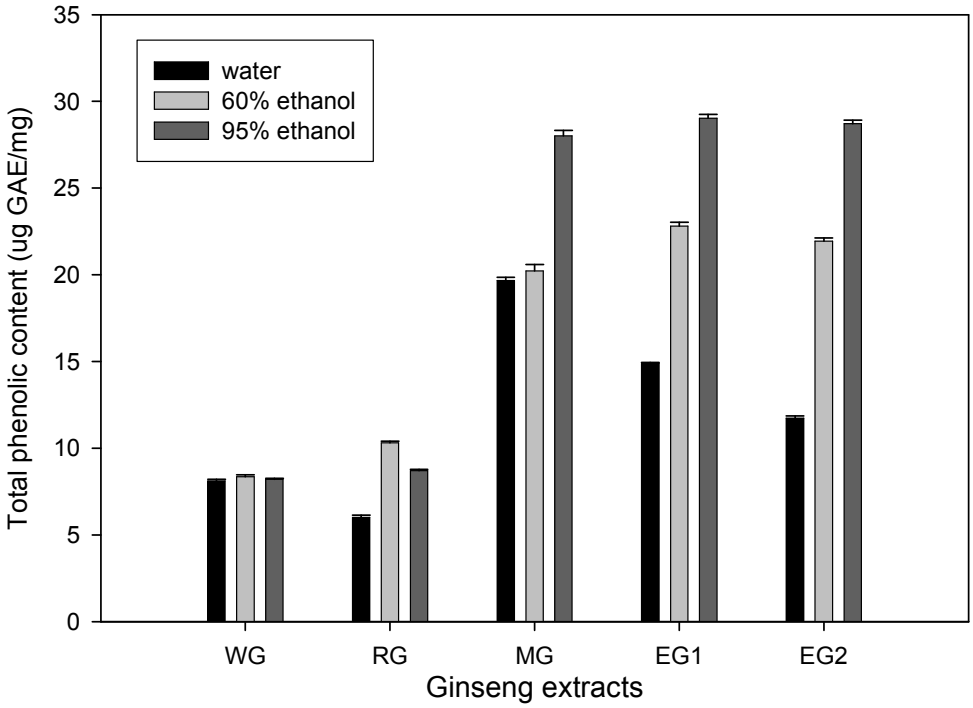


Fig. 38. Total phenolic content of ginseng extracts. Values are means of triplicate determinations (n = 3) ± standard deviation.

WG: White ginseng

RG: Red ginseng

MG: Root hair of tissue cultured mountain ginseng

EG1: Extruded by root hair of tissue cultured mountain ginseng (MG) (moisture content: 25%, barrel temperature: 125℃)

EG2: Extruded by root hair of tissue cultured mountain ginseng (MG) (moisture content: 35%, barrel temperature: 125℃)

phenolic compounds는 산삼배양근, 수분함량 25% 압출성형 산삼배양근, 수분함량 35% 압출성형 산삼배양근의 95% ethanol 추출물에서 높았으며 60% ethanol 추출물과 물 추출물 순 이였다. 하지만, 홍삼과 백삼에서는 60% ethanol> 95% ethanol> water순으로 높은 phenolic compounds를 나타내었다. 압출성형 후 95% ethanol과 60% ethanol의 phenolic compounds가 증가하였고 수분함량 25% 압출성형 산삼배양근이 높은 함량을 함유한 것으로 측정되었다. 그러므로 더 나은 항산화효과는 수분 함량의 조절로 인한 압출성형 인삼에 의해 얻어질 수 있다.

나. DPPH에 의한 전자공여능

DPPH에 의한 전자공여능 측정은 Fig. 39에 나타내었다. DPPH 전자공여능은 산삼배양근이 홍삼과 백삼에 비해 월등히 높게 측정되었다. 이것은 산삼배양근의 항산화성분 함량이 매우 높다는 것으로 보인다. 게다가, DPPH의 전자공여능 활성은 압출성형 산삼배양근이 산삼배양근보다 높은 함량을 보였다. 이 결과 또한 압출성형으로 인한 DPPH의 전자공여능의 증가를 확인 할 수 있다.

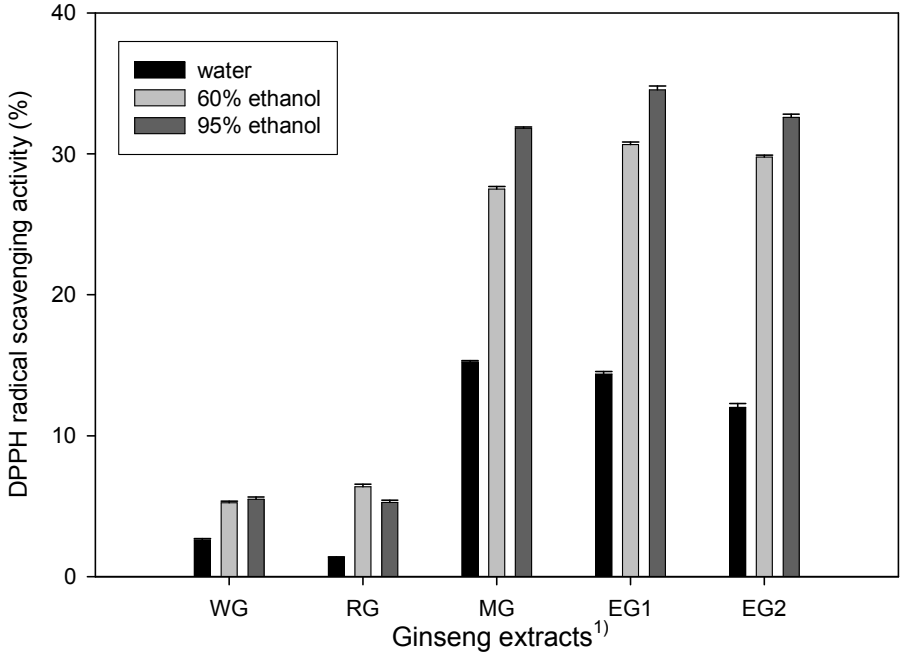


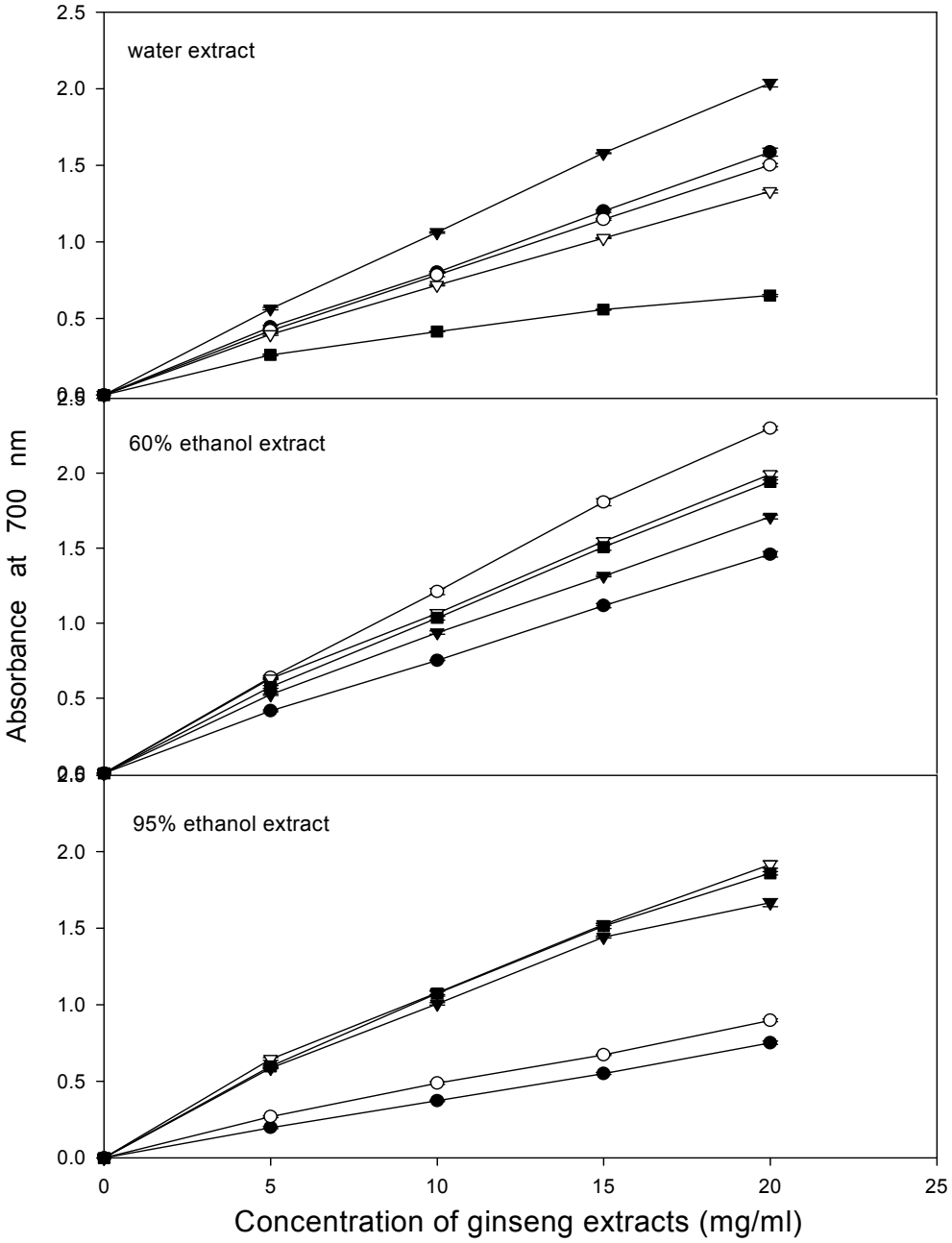
Fig. 39. DPPH radical scavenging activity of ginseng extracts. Values are means of triplicate determinations (n = 3) ± standard deviation.
1) Refers to Fig. 38.

용매 중에는 95% ethanol 추출물의 DPPH 전자공여능이 대부분 강하게 측정되었으며, 다음으로 60% ethanol, 물 추출물 순이었다. 게다가, 95%와 60% ethanol 추출물은 오차범위가 $P < 0.01$로 유의적인 결과를 나타냈으며 물 추출물보다 높게 측정되었다. 95% ethanol 추출물의 DPPH 전자공여능은 60% ethanol 추출물 보다는 조금 더 높게 측정되었다($P>0.05$).

다. 환원력 측정

3가지 용매로 추출한 인삼의 환원력은 potassium ferric cyanide reduction method를 이용하여 측정하였으며 결과는 Fig. 40에 나타내었다. 일반적으로 같은 용매에서는 phenolic compounds와 DPPH 전자공여능에서와 같이 산삼배양근과 압출성형 산삼배양근의 환원력이 홍삼과 백삼보다 높게 측정되었다. 하지만 60% 추출물에서는 홍삼이 다른 추

출물보다 높은 환원력을 갖는 것으로 측정되었다. 인삼 농축액의 환원력은 농도가 높아질수록 환원력 또한 높아진다는 것을 Fig. 16을 통해 확인 할 수 있었고 60% ethanol 인삼 추출물의 환원력이 높게 측정되었으며, 95% ethanol과 water 추출물의 순으로 측정되었다. 통계분석을 통하여 유의적인 상관관계를 알아본 결과 phenolic compounds와 reducing power, r = 0.516, $P<0.01$,그리고 DPPH 전자공여능과 reducing power, r=0.463,$P<0.01$로 나타났다.



—●—WG —○—RG —▼—MG —▽—EG1 —■—EG2 [1)]

Fig. 40. Reducing powers of ginseng extracts. Values are means of triplicate determinations (n = 3) ± standard deviation.[1)] Refers to Fig. 38.

라. 항균활성 측정

사용되는 6가지 균주 중 3가지(*B. subtilis, L. monocytogenes, S. epidermidis*)는 Gram 양성균이었으며 나머지 3가지 (*E. coli, S. typhimurium, P. aeruginos*)는 Gram 음성균을 사용하였다. 유의적인 차이를 둔 15가지 추출물의 항균활성을 측정하여 Table 16에 나타내었다.

Table 16. Inhibition Zones (mm) of ginseng extracts[1)] (500 mg/ml)against icroorganism

Ginseng Extracts	60% ethanol			95% ethanol		
	B.Subtilis	L.monocy-togenes	S.epidermidis	B.Subtilis	L.monocyto-genes	S.epiderm-idis
WG	8.06±0.06a	–	9.58±0.09a	9.21±0.14a	–	9.97±0.11a
RG	7.74±0.03b	–	–	–	–	–
MG	8.15±0.05c	–	–	10.25±0.03b	7.20±0.03a	10.38±0.17b
EG1	10.92±0.06d	8.06±0.09a	11.38±0.06b	11.23±0.10c	9.26±0.10b	11.63±0.10c
EG2	11.37±0.02e	10.00±0.12b	10.89±0.07c	12.42±0.19d	10.54±0.10c	11.06±0.06d

Values are means of triplicate determinations (n = 3) ± standard deviation; different letters indicate significant difference (P<0.05). "–" , no inhibition zone.

[1)] Refers to Fig. 38.

인삼 추출물은 Gram 양성 균에 대해서는 항균활성을 보였지만 Gram 음성 균에 대해서는 억제를 나타내지 않았다. Gram 양성 균 3가지에 대한 저해 결과는 *B. subtilis* clear zone의 직경이 7.74~12.42 mm로 가장 강한 항균활성을 보였고, *S. epidermidis* 9.58~11.63 mm, *L. monocytogenes* 7.20~10.54 mm순으로 측정되었다. 하지만 물 추출물은 억제율이 가장 높은 *B. subtilis*를 비롯하여 모든 균주에 대하여 항균활성을 보이지 않았다. 95% ethanol 추출한 압출성형 산삼배양근(수분함량 35%) 농축액은 *B. subtilis*에 대한 저해환이 12.42 mm로 가장 크게 나타났고, 다음으로 60% ethanol 추출물의 농축액이 11.37 mm, 95% ethanol 추출한 압출성형 산삼배양근(수분함량 25%)이 11.23 mm, 60% ethanol 추출한 압출성형 산삼배양근(수분함량 25%) 10.92 mm 순으로 저해를 나타냈다. *L. monocytogenes*에 대해서는 *B. subtilis*와 같은 조건에서 ethanol 10.42 mm, *S. epidermidis*는95% ethanol 추출한 압출성형 산삼배양근(수분함량 25%) 농축액에서 11.68 mm로 나타나 백삼과 홍삼보다 압출성형 공정을 거친 인삼의 항균성이 높았음을 확인할 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발의 달성도

연도	연구개발의 내용	추 진 일 정												연구비 (천원)	비 고
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
2006	-라이브러리 제작 및 스크린 -SSR 서열의 대량분리 -홍삼화를 위한 압출성형공정 최적화													120,000	
2007	-다형성 SSR 마커의 분리 및 특성분석 -압출시스템의 scale-up -홍삼기능성 식품 소재화													120,000	
2008	-인삼 개체별 고유 DNA ID의 부여 -Haplotype ID의 DNA 바코드화 -고품격·고기능성 식품 개발													120,000	

계획
달성

2. 평가의 착안점 및 실적 비교

구분	세부연구개발 목표	가중치 (%)	평가의 착안점	실적	달성도 (%)
1차 년도	라이브러리 스크린: SSR 서열의 분리	30 %	SSR-library 제작 및 800 좌위 이상의 SSR 서열 분리	842 SSR 좌위 분리	100
	SSR 좌위별 PCR 증폭조건 및 genotyping 조건 확립	30 %	200 SSR 이상 확립	200 좌위의 SSR-특이적 primer 제작	100
	배양근 분말의 홍삼화를 위한 압출성형공의 최적화	40 %	최대 효율성을 위한 공정변수 확립여부	Rg_3 등 홍삼-특이 성분이 검출되는 압출성형 조건 확립	100
2차 년도	변별력이 높은 SSR 마커의 분리: 재현성 확립	40 %	품종별-특이 좌위의 분리	12개 초다형성 좌위 분리, 15개 종간 구분 마커 분리, 교차적용성 94.8%	100
	압출성형 시스템의 scale- up 설계	30 %	압출성형반응기 용량 50 kg/hr	50 kg/hr 설계완료	100
	산삼홍삼의 기능성 식품 소재화	30 %	홍삼 고유성분의 고농도 함유 여부 조사(말톨, Rg_3 등)	고기능성 압출 산삼 배양근 식품소재 개발 (Rg_3 검출, 항산화기능 및 항균 기능확인)	100
3차 년도	10 SSR haplotype DNA ID 개발	30 %	변별력: 99.99% 이상	11 SSR haplotype을 이용한 DNA ID 개발: 변별력 99.999% 이상	100
	Multiplex PCR kit의 개발	30 %	SSR 동시증폭 키트	Tereaplex 및 duplex SSR PCR kit 개발	100
	산삼 배양근을 이용한 고품격・고기능성 식품 개발	40 %	3종 이상 개발	고기능성 식품소재 3종개발(압출성형배양근, 압출발효액, 압출배양근 농축액)	100
최종 평가	인삼류의 DNA 지문(ID) 개발 및 배양근에 대한 적용	30 %	원 산삼과 계대배양 세포주의 동일 족보의 신속・정확한 확인	높은 변별력(에러율: 10^{-4}-10^{-14})의 DNA ID 개발 및 2차원 DNA 바코드화 기술 개발	100
	압출성형공정에 의한 산삼 배양근의 홍삼화	30 %	고기능성 식품 소재의 개발로 신 수요층 개발	홍삼성분 및 산성다당체, 페놀성분이 풍부한 항산화, 항균 기능이 강화된 산삼홍삼 소재 3종 개발	100
	주요 개발기술의 특허화 및 상품화, SSR 좌위 정보의 DB화	40 %	특허 3건 이상, 시제품 3건 이상 실용신안 및 상표등록 2건 이상	-특허 및 상표 5건 -DNA 바코드 및 식품소재 시제품 4종 -논문 6건(SCI 3건), 학회발표 8건 -인삼 SSR 좌위의 DB 구축 및 NCBI 등록	100

3. 관련분야에의 기여도

○ 최근 산삼 배양근의 기내배양을 통한 대량 생산이 이루어지는데, 본 연구에서 처음으로 개발된 SSR haplotype ID와 2차원 DNA 바코드를 이용한다면, 원 산삼근과 추후에 그로부터 유래된 배양근이 동일한 개체인지를 정확하게 밝힐 수 있다. 이것은 사람의 친자확인·개인식별을 위해 10좌위 이상의 microsatellite 유전자형을 이용하는 법의학적 원리를 식물 개체의 식별에 처음으로 도입하는 흥미로운 일이다. 향후 SSR ID는 산삼뿐만 아니라 taxol 생산을 위한 주목 조직의 기내 배양 등 다양한 배양세포와 '춘란'과 같이 주로 영양번식을 하는 고급 식물의 족보(계통)를 입증하는데도 유용하게 응용될 수 있을 것이다.

○ 인삼에 대한 SSR-enriched library 제작과 스크린을 수행하여 250여개의 SSR 서열의 대량 분리는 국내외적으로 처음 수행된 연구로서, 인삼의 원산지 확인 및 화기삼 등 근연종간의 구분 등에 매우 유용하게 활용될 것이다. 아울러, 본 연구에서 개발된 SSR 마커는 종내/종간 구분 마커로서의 활용성뿐만 아니라, 인삼의 우수 품종의 유전육종을 위한 분자적 마커로서 유용하게 활용되어, 염색체 지도작성, 연관분석 및 QTL 좌위의 분리에도 이용될 것이다.

○ 본 개발팀이 국내외적으로 처음으로 시도하는 산삼과 홍삼의 좋은 이미지를 결부시킨 '산삼홍삼'의 개발은 폭넓은 소비층을 확보하게 할 것이며, 또한 원 산삼근에 대한 DNA ID를 부여한 품질인증제 도입은 산업적 파급 효과를 배가시킬 것이다. 현재 인삼제품 특히 홍삼의 국내 제조기술은 외국에 비교하여 경쟁력이 있다. 그런데 홍삼제품은 홍삼차, 홍삼엑기스, 캡슐, 홍삼드링크 등 단순하여 외국에서 인삼의 소비시장의 성장세가 지속되어 필요한 기술이 개발되면 지금의 국내기술력은 한계에 직면할 것으로 판단된다. 이러한 한계를 극복하기 위해서 유전적 계보가 확인된 우수한 산삼 배양근의 확보와 압출성형공정에 의한 산삼 배양근의 홍삼화를 연속공정 기술로 개발한다면, 산삼홍삼소재의 제조기술은 세계적인 경쟁력을 가질 것이다.

○ 본 연구의 최종목표는 배양근을 압출성형공정으로 홍삼화하여 유용 성분의 강화로 고품격의 신기능성 '산삼홍삼 식품소재'를 개발하는 것이다. 압출성형 산삼배양근의 홍삼화와 이화학적 특성분석, 고기능성 식품중간소재 개발을 위한 압출성형공정변수에 따른 산삼배양근의 발효특성분석, 압출성형 산삼배양근 발효액과 농축액의 항산화활성 및 항균활성 등의 분석을 통하여 산삼홍삼 식품소재를 개발하고자 한 바 연구 종료 시점에서 소기의 목표를 달성하였다.

○ 고기능성 산삼홍삼 식품소재 및 가공공정의 개발은 세계적으로 처음 개발된 신기술로서, 개발된 산삼홍삼 식품소재는 항산화활성과 항균활성이 뛰어나 다양한 식품에 첨가할 경우 산삼과 홍삼의 좋은 이미지가 합쳐진 시너지 효과로 인삼 시장의 새로운 수요 창출은 물론 국제 시장의 선점 효과를 가져다 줄 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 특허, 논문 및 학회발표 성과 및 계획

1. 논문게재 및 예정

게재 연도	논문명	저자		학술지명	Vol. (No.)	구분
		교신저자	공동저자			
2007	Identification of new microsatellite markers in *Panax ginseng*	정기화	김준기, 류기형 이경룡, 윤의수	Molecules and Cells	24(1): 60-68	SCI급
2007	Isolation of new microsatellite sequences in *Acanthopanax senticosus*	정기화	김준기	J. Pant Biol.	50(5): 557-561	SCI급
2008	압출성형 산삼 배양근의 이화학적 특성 및 침출 특성의 비교	류기형	정기화, 한재윤	J Korean Soc Food Sci Nutr	37(8): 1018-1024	학진 등재
2008	압출성형 산삼배양근의 발효 특성	류기형	양혜진, 기염청 정기화	J Korean Soc Food Sci Nutr	37(12): 1654-1659	학진 등재
2009	Characterization of polymorphic microsatellite loci in cultivated and wild *Panax ginseng*	정기화	조범호, 서동상 조은민, 김준기 류기형	Genes and Genomics	31(2): 119-127	SCI급
2009	Comparison of fermenta-tion characteristics for extruded root hair of tissue cultured mountain ginseng.	류기형	기염청, 양혜진 김미환, 김철, 정기화	한국식품영양과학회	In press	학진 등재
2009	Polymorphism of mitoch-ondrial DNA control region in the swimming crab *P. trituberculatus*	정기화	조은민, 황춘홍 Kanwal S, 김제년	Fishery Sci	투고중	SCI급
2009	Antioxidant and antibacterial activities of ginseng and extruded ginseng extracts	류기형			투고준비 중	
2009	Genetic polymorphism of microsatellites (SSR) in *Panax ginseng*	정기화			투고준비 중	

2. 학회발표

발표 연도	논문명	저자		학회명	개최장소	구분
		교신저자	공동저자			
2006	Development of microsa-tellite (Simple Sequence Repeats: SSR) markers in *Panax ginseng*	정기화	최은경, 황수진 백충렬, 조삼래	한국생물 과학협회	한양대학 (서울)	국내
2007	Identification of new microsatellite markers and development of multiplex PCR system in *Panax ginseng*.	정기화	조범호, 김준기 정다은, 이연우	한국분자·세포생물 학회	서울 COEX	국내
2008	Development of Y-STR 12-plex PCR system and forensic application	정기화	박지환, 박선화 이경룡	한국생물 과학협회	목포대학 (전남)	국내
2008	Development of microsa-tellite (SSR) markers in Orchid, *Cymbidium goeringii*	정기화	조은민, 김제년 박선화	Int. Congress on Cell Biology	서울 COEX	국제
2008	압출성형공정변수에 따른 산삼배양근의 발효특성	류기형	양혜진, 박종한 손지혜, 김미환	한국산업 식품공학회	일산 KINTEX	국내
2008	Chemical components of root hair of tissue cultured mountain ginseng and extruded ginseng	류기형	기염청, 김철 한재윤	한국산업 식품공학회	일산 KINTEX	국내
2008	Extruded root hair of tissue cultured mountain ginseng extract and their functional characterization	류기형	기염청, 김철 김미환	한국식품 영양과학회	제주 라마다호텔	국내
2008	압출성형 공정변수에 따른 미삼의 발효특성	류기형	양혜진, 손지혜, 김철, 류기형	한국식품 영양과학회	제주 라마다호텔	국내

3. 특허 및 기타 지적재산권

구분	년도	특허명	발명자	권리권자	출원(등록) 번호
출원	2007	압출성형공정을 이용한 산삼 배양근의 홍삼화 공정	정기화, 류기형 한재윤	공주대학교 산학협력단	10-2007-0031610
	2008	인간 성염색체 짧은 연쇄 반복 염기서열의 동시증폭 키트 및 방법	정기화	공주대학교 산학협력단	10-2008-0036993
	2009	기내배양으로 생산된 인삼류의 SSR 복합 유전자형을 이용한 계보검증이 가능한 DNA ID의 확립 및 2차원 바코드 표기법	정기화	공주대학교 산학협력단	출원준비중
등록	2007	인삼 및 화기삼 의 마이크로새틀라이트 마커 및 증폭 프라이머	정기화, 류기형, 김준기	공주대학교 산학협력단	10-0742721
	2007	인삼과 화기삼 간의 종간 다형성을 나타내는 마이크로새틀라이트 마커	정기화, 조범호 김준기	공주대학교 산학협력단	10-0742712
상표 등록	2007	홍산 (홍삼 + 산삼의 합성어임)	정기화	공주대학교 산학협력단	40-0696335

제 2 절 실용화·산업화 실적 및 계획

1. 특허기술의 실용화

○ 확립된 인삼 SSR 마커 정보의 특허기술의 활용: 산삼배양근의 계보 확인 및 인삼과 화기삼의 구분 등 원산지 확인에 직접적으로 활용될 것임

○ 압출성형공법을 이용한 산삼 배양근의 홍삼화 기술: 참여기업인 (주)씨비엔바이오텍 및 기타 산삼배양근 생산업체에 기술이전을 통해 산삼배양근의 고품격화

○ '기내배양으로 생산된 인삼류의 SSR 복합 유전자형을 이용한 계보검증이 가능한 DNA ID의 확립 및 2차원 바코드 표기법'에 대한 추가적인 특허 출원 준비중

2. 제품개발 및 산업체기술이전 방안

○ 고기능성 3종의 소재 개발: 압출성형공법을 이용한 홍삼화 소재, 홍삼화 배양근의 발효 소재, 압출성형 산삼배양근의 농축액의 기업 이전 추진

○ 개발된 상기 3종의 식품 소재에 대한 성분 분석 결과 폴리페놀의 함량이 높으며, 항

산화 기능이 보강되는 등, 약리 효능이 보강됨이 확인되었으므로, 본 사업의 참여기업이나 다른 식품 회사를 통한 개발기술의 이전 및 개발품의 조기 실용화 추진

3. 기타 활용방안

○ 본 연구를 통하여 동정된 인삼 SSR 염기서열의 NCBI 등록(30 좌위 이상)

○ 인삼 SSR 정보의 데이터베이스 구축: 연구 결과의 공유화로 유전육종연구, 염색체 지도작성, 유용 유전자 분리 및 genome wide scan에 활용될 것임

○ 중국삼의 물량공세와 미국삼 등의 기능성을 강조한 제품의 공급으로 세계시장에서의 고려인삼의 입지를 위협하고 있다. 특히 음성적으로 유통되는 외국삼은 국내 인삼의 시장 질서를 어지럽힘은 물론, 고려인삼 자체의 신용도를 깎아 내리는 원인이 되고 있다. 따라서 본 연구에서 고려인삼 특이적 DNA식별 마커를 개발함으로서 고려인삼의 유전적 Identity를 제공하며, 고려인삼을 외국삼과 신속·정확하게 구분할 수 있게 하고, 병충해-저항성 형질전환 인삼의 생산 기반을 마련할 것이며, 궁극적으로 국내 인삼 산업의 활성화는 물론 대외적인 수출촉진에 기여할 것이다.

4. 기대성과

○ 산삼홍삼 강화 식품에 사용될 산삼 배양근에 대한 DNA ID를 부여하고 제품에 직접 표시하는 일은 품질 인증은 물론 유사품을 근본적으로 방지하는 수단이 될 것이다.

○ 산삼 배양근의 홍삼화는 처음 시도되는 기술로서 산삼과 홍삼의 지명도와 효능성을 하나의 제품에 담을 수 있는 획기적인 기술로서 평가될 것이다 (홍삼과 산삼의 합성어를 의미하는 '홍산'의 상표등록 완료).

○ 산삼의 배양근의 홍삼화는 본삼류 중심의 단순 1차 가공 기술에서 탈피하고 다양한 소비층을 겨냥한 고품격 제품을 개발한다는 측면에서 산업적 파급효과는 크다.

○ 산삼홍삼 제품의 수출: 외국인의 기호에 맞게 산삼 배양근의 홍삼화를 통한 홍삼강화 팽화제품을 개발하여 산삼의 우수성과 신기술이 조화를 이룬다면 세계시장으로의 수출이 가능할 것이다.

제 3 절 교육·지도·홍보 및 기술확산 계획

1. 인력활용/양성 성과

총인력 양성 인원	지원 대상 (학위별)				성별	
	박사	석사	학사	기타	남	여
13	3	7	2	1	7	6

2. 교육 및 지도활동 내역

연도	교육명	주요내용	장소	비고
2008	Microsatellite(STR)의 법의학적 유용성	유전적 마커의 종류별 특성 및 STR의 법의학적 변별력	충남대	특강
2008	생물통계학	집단유전학의 통계학	경희대	하계 특강

3. 기술확산 및 타 연구에 활용성과

○ 본 연구에서 제작한 인삼의 SSR library를 이용하여 추가적인 SSR 마커의 동정이 가능하며, 분리한 마커를 이용하여 유전육종을 이용한 stress-내성 식물체 혹은 친환경 식물 품종 개발, 새로운 유용 유전자의 분리, QTL 좌위의 분리 및 염색체 지도 작성에 활용할 것이다.

○ 인삼 SSR 마커를 대상으로 제작된 116개의 SSR 특이적 primer 중 110개가 화기삼(*P. quinquefolius*)에서도 증폭되어(94.8%), 높은 종간 교차 적용성을 확인할 수 있었다. 그렇지만, 본 연구는 단지 화기삼에 대해서만 적용성을 검사하였으므로, 향후 연구에서는 전칠삼, 죽절삼 등 다양한 삼 종류에 대해 적용해 봄으로서 본 마커의 활용범위를 넓힐 것이다.

○ 인삼의 DNA 바코드 개발은 인삼 및 근연종의 분류학적 위치를 확인함은 물론, 인삼과 산삼의 유연관계를 밝히는데 결정적인 단서를 제공할 것이다. 인삼의 SSR 개발과 활용은 국내 주요 기능성식물의 유전자원 보호와 활용성을 높이는데 기여할 것이며, 아울러 식물 유전체학 연구 및 바이오정보학의 활성화에 도움을 줄 것이다.

○ SSR DNA ID는 기내배양 식물조직의 세포족보 (cell lineage) 인증 및 고급 영양번식 식물체(예: 희귀성 난)의 식별법으로 유용하게 활용될 것이다. 기내배양 식물체의 SSR 마커를 분석하고 이에 대한 DNA ID를 부여하는 일은 식물 재료에 대한 품질 인증은 물론 유사품을 근본적으로 방지하는 수단이 될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

<해당사항 없음>

제 7 장 참고문헌

Ando T, Tanaka O, Shibata S. 1971. Chemical studies on the oriental plant drugs.(XXV) Comparative studies on the saponins and sapogenins of ginseng and related crude drugs. Soyakugaku Zasshi 25: 28.

Ann YG, Lee SK. 1996. Studies on the ginseng wine. Korean J Food Nutr 9: 151-159.

AOAC. 1985. Official method of analysis. 16th ed. Association of official Analytical Chemist, Wastinton, DC, USA.

AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC, USA.

Belogortseva NI, Yoon JY, Kim KH. 2000. Inhibition of Helicobacter pylori hemagglu-tination by polysaccharide fractions from roots of *Panax ginseng*. Planta Medica 66: 217-220.

Bourne MC. 1982. Food texture and viscosity: concept and measurement. Academic Press, NewYork, USA.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology, 28: 25-30.

Chae SK, Kang KS, Lew ID, Ma SJ, Bang KY, Oh MH, Oh SH. 2004. The average food analytics theory and experiment. Jigu Publishing Co. p 563-567.

Chang DI, Chang KS. 2001. Development of a process for manufacturing the best quality red ginseng. Report of ARPC. p 170-178.

Chen et al. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. Ann. Bot. (Lond). 93: 67-73.

Coleman CI, Hebert JH, Reddy P. 2003. The effects of *Panax ginseng* on quality of life. J Clin Pharm Ther 28: 5-15.

Dickinson E, Stainsby G. 1982. Colloid in food. Elsevier Applied Science Publishers, New York, USA.

Do JH, Lee HOK, Lee SK, Jang JK. 1993. Colormetric determination of acidic polysaccharide from *Panax ginseng*, its extraction condition and stability. Korean J Ginseng Sci 17: 139-144.

Doi E, Shibata D, Matoba T. 1981. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. Analytical Biochmistry 118: 173-184.

Dubois M, Gillers KA, Hamilton JK, Rdbers PA, Smith F. 1956. Colormetric method for determination of sugar and related substance. Anal Chem 28: 50-352.

Ellis JM, Reddy P. 2002. Effects of Panax ginseng on quality of life. Ann

Pharmacother 36: 375-379.

Esteve MJ, Frigola A, Martorell L, Rodrigo C. 1999. Kinetics of green asparagus ascorbic acid heated at high-temperature themoresistometer. Z Lebem Unters Forsch 208: 144-147.

Fischer D, Bachmann K. 1998. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). Biotechniques 24: 796-802

Food code. 2002. Korea Food & Drug Administation. Korea. Seoul. p 389-390.

Fujino et al. 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet.

Ha DC, Kim BS, Byun EH, Lee JW, Ryu GH. 2004. Optimization of extrusion process variables for red ginseng manufacturing. 70th Annual Conference in Korean Society of Food Science and Technology 200.

Ha DC, Lee JW, Ryu GH. 2005. Effect of barrel temperature and screw speed on characteristics of extruded raw ginseng. J Ginseng Res 29: 107-112.

Ha DC, Ryu GH. 2005. Chemical components of red, white and extruded root ginseng. J Korean Soc Food Sci Nutr 34: 247-254.

Hamilton MB, Pincus EL, Di FA, Fleischer RC. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. Biothechniques 27: 500-507

Han BH, Park MH, Han YN, Suh DY. 1992. Chemical and biochemical study on non-saponin constituents of Korean ginseng. Korean J Ginseng Sci 16: 228-234.

Han JY, Kim C, Ryu GH. 2007. Comparison of fermentability and characteristics of fermented broths for extruded white ginseng at different barrel temperature. J Korean Soc Food Sci Nutr 36: 1211-1218.

Han JY, Kim MH, Jin T, Solihin BW, Ryu GH. 2006. Extrusion of ginseng root in twin screw extruder: pretreatment for hydrolysis and saccharification of ginseng extrudate. J Food Sci Nutr 11: 318-322.

Harper JM. 1989. Food extruders and their application. In extrusion cooking. C, Linko P, Harper JM, des. AACC, St. Paul, MN, p 1-18.

Hong WC, Nana Y, Hiroyuki T, Akira Y. 2003. Isolation and characterization of simple sequence repeat markers in the hexaploid forage grass timothy (*Phleum pratense L.*). Theor Appl Genet 107: 1337-1349.

Hon C.C. et al. 2003. Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine. Acta Pharmacol. Sin. 24: 841-846.

Hwang SY, Park SW, Park SJ, Han K. 2006. Therapeutic effect of tissue cultured root

of mountain panax ginseng C. A. mayer against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced toxicity in rat. Yakhak Hoeji 50: 220-227.

Hwang WI, Oh SK. 1984. A study on the anticancer activies of lipid soluble ginseng extract and ginseng saponin derivatives against some cancer cells. Korean J Ginseng Sci 8: 153-166.

Inomata S, Yokoyama M, Gozu Y, Shimizu T, Yanagi M. 1993. Growth pattern and ginsenoside production of Agrobacterium-transformed Panax ginseng roots. Plant Cell Rep 12: 681-686.

Jane H, Monique B, Francoise N, Francois P, Jean D. 2008. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. Food Chem 109: 709-721.

Jang SA, Moon SK. 2005. Analysis of total sugar by extraction condition and material to develop the extraction process of ginseng polysaccharide. Korean J Food preserv 12: 367-371.

Jang KJ, Yu TJ. 2007. Studies on the components of Sokoju and commercial Yakju. Korean J Food Sci Technol 13: 307-313.

Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K. 2008. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. Food Chem 109: 227-234.

Jee HK, Cho YJ, Kim CT, Jang YS, Kim CJ. 2006. Increase of solubility of ginseng radix by extrusion cooking. Korean J Food Sci Technol 38: 361-368.

Jeong HS, Kang TS, Woo KS, Paek KY, Yu KW, Yang SJ. 2005. Effects of cultured wild ginseng roots on the alcoholic fermentation. Korean J Food Preserv 12: 402-410.

Jeong CS, Chakrabarty D, Hahn EJ, Lee HL, Paek KY. 2005. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. Biochemical Engineering J 27: 252-263.

Joo CN, Kwak HS. 1988. The effect of ginseng saponin fraction on antioxidant activity of α-tocopherol. Korean J Ginseng Sci 12: 128-134.

Jung HS, Kang TS, Woo KS, Paek KY, Yu KW, Yang SJ. 2005. Effect of cultured wild ginseng roots on the alcoholic fermentation. Korean J Food Preserv 12: 402-410.

Kim BS, Ryu GH. 2005. Properties of extracts from extruded root and white ginseng at different conditions. J Korean Soc Food Sci Nutr 34: 306-310.

Kim JY, Sung KW, Bae HW, Yi YH. 2007. pH, acidity, color reducing sugar, total

sugar, alcohol and organaleptic characteristics of puffed rice powder added Takju during fermentation. Korean J Food Sci Technol 39: 266-271.

Kim JS, Yoon KS, Lee YS. 2008. Antioxidant activity of main and fine roots of ginseng (*Panax Ginseng* C. A. Meyer) extracted with various solvents. Food Sci Biotechnol 17: 46-51.

Kuhnau. 1976. The Flavonoids:a class of semiessential food components: their role in human nutrition. World Rev Nutr Diet 24: 117-120.

Lee JH, Park EK, Uhm CS, Chung MS, Kim KH. 2004. Inhibition of helicobacter pylori adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from Artemisia capillaris and Panax ginseng. Planta Medica 70: 615-619.

Lee JH, Lee JS, Chung MS, Kim KH. 2004. In vitro anti-adhesive activity of an acidic polysaccharide from Panax ginseng on porphyromonas gingivalis binding to erythrocytes. Planta Medica 70: 566-568.

Li et al. 2003. Sequence variations of simple sequence repeats on chromosome-4 in two subspecies of the Asian cultivated rice. Theor Appl Genet.

Ma KH, Dixit A, Kim YC, Lee DY, Kim TS, Cho EG, Park YJ. 2007. Development and characterization of new microsatellite markers for ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Conserv Genet 8: 1507-1509.

Meuser F, Wiedmann W. 1989. Extrusion plant design. In extrusion cooking. Mercier C, Linko P, Harper JM, eds. AACC, St. Paul, MN: 91-155.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31: 426-428.

Min YK, Cho JG. 1994. Fermentation characteristics of some medicinal herb rice wine. The Korean Society for Applied Biological Chemistry 37: 175-181.

Moon HS, Kwon HJ, O PS. 1998. Studies on the alcohol fermentation with extruded tappioca starch. Korean J Appl Microbiol Biotechnol 16: 231-237.

Namba T, Yoshizaki M, Tominmori, Kobashi K, Matsui K, Hase J. 1974. Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs.Ⅲ. Chemical and biochemical evaluation of ginseng and related crude drugs. Yakugaku Zasshi 94: 252.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards. NCCLS Document M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

Okuda T, Yoshioka Y, Ikekawa T, Chihara G, Nishioka K. 1972. Nature(London), New Biol 238: 57-60.

Prentice JH. 1984. Measurements in the rheology of foodstuffs. Elsevier Applied

Science Publishers, NewYork, USA.

Pyo YH, Lee TC, Logendra L, Rosen RT. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (Beta vulgaris subspecies cycla) extracts. Food Chem 85: 19-26.

Randhir R, Vattem D, Shetty K. 2004. Solid-state bioconversion of fava bean by Rhizopus oligosporus for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. Innovate Food Sci Emerg Tech 5: 235-244.

Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. Food Chem 66: 401-436.

Roh SK, Song JS, Park KH. 2001. Alcohol fermentability of Insam starch and characteristics of Insam wine. Food Engineering Process 5: 43-51.

Ryu GH, Remon JP. 2004. Extraction yield of extruded ginseng and granulation of its extracts by cold extrusion-spheronization. J Korean Soc Food Sci Nutr 33: 899-904.

Sahagun JF, Harper JM. 1980. Effect of screw restrictions on the performance of an autogenous extruder. J Food Proc Eng 3: 199-216.

Shih PW, Lai PL, Jen HWK. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chem 99: 775-783.

Sherman P. 1979. Food texture and rheology. Academic Press, New York, USA.

Tang W, Eisenbrand G. 1992. *Panax ginseng* C. A. Mayer. Chinese Drugs of Plant Origin, Springer, Berlin 710-737.

Woo JS, Ha BH, Kim TG, Lim YH, Kim KH. 2001. Development of an enzyme-linked glycosorbent method to monitor the inhibition of sialic acid-dependent helicobacter pylori adhesion. Biotech Letters 23: 507-511.

Yan et al., 2003. Mapping quantitative trait loci associated with rice grain shape based on an indica/japonica backcross population. Yi Chuan Xue Bao. 30: 711-716 (2003).

Yildirim A, Mavi A, Kara AA. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49: 4083-4089.

Yoo BS, Chang MS, Byun SY. 2003. Characterization of cell cultures and ginsenoside production by cultured ginseng and wild mountain ginseng. Korean J Biotechnol Bioeng 18: 133-139.

Yoshikawa T, Furuya T. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with Agrobacterium rhizogens. Plant Cell Rep 6: 449-453.

Yu et al. 2003. Intraspecific relationship analysis by DNA markers and in vitro cytotoxic and antioxidant activity in *Eleutherococcus senticosus*. Toxicol In Vitro.

17: 229-236.
Yu KW, Murthy HN, Jeong CS, Hahn EJ, Paek KY. 2005. Organic germanium stimulates the growth of ginseng adventitious roots and ginsenoside production. Process Biochemistry 40: 2959-2961.
Maize DB (www.agron. missouri.edu)
주류분석규정. 2006. 국세청기술연구소. 서울. p 39-41.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.