

최 종
연구보고서

산삼배양액의 효과 규명 및 이를
이용한 사료첨가제 개발

전북대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산삼배양액의 효과 규명 및 이를 이용한 사료첨가제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 7월 14일

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 박 상 열

세부연구책임자 : 채 준 석

 " : 강 형 섭

연 구 원 : 류 경 선

 " : 류 연 선

 " : 설 재 원

 " : 디벤드라샤

참 여 기 업 : (주) 이앤티

요 약 문

I. 제 목

산삼배양액의 효과 규명 및 이를 이용한 사료첨가제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

희귀식물을 대량 생산하는 첨단 생명공학기술을 응용하여 산삼을 실험실에서 조직배양 시키는 기술이 최근 국내 연구자들에 의해 개발되었다. 세계적으로 뛰어난 약효를 인정받고 있는 특수 식물중 산삼을 실험실에서 조직배양시킨 후 산삼을 분리하고 남은 배양액을 산삼 배양액이라고한다. ㈜이엔티에서는 산삼 연구팀과 전략적 제휴를 통해 산삼을 증식시키고 남은 산삼 배양액을 다양한 목적으로 이용할 수 있게 되었다. 지금까지는 버려져 왔던 폐기물로서의 산삼 배양액을 이용하여 축산업의 사료첨가제로서 활용한다면 질병 예방 및 고품질 축산물의 생산에 기여할 것이다. 산삼 배양액에는 사포닌 성분외에 많은 성분들이 다량 함유되어 있음이 발견되었다. 사포닌 성분의 인체에 대한 효능과 다양한 작용들은 이미 인삼 등의 연구에서 잘 밝혀져 있다. 면역기능 증강작용, 암세포 증식 억제작용, 항염증작용 그리고 단백질 합성 촉진작용 등이 바로 그것이다. 따라서 산삼 배양액을 활용한 다양한 연구개발이 절실히 필요한 실정이다.

산업동물 생산에서 가장 큰 문제점 중에 하나는 면역력이 저하되고 있다는 사실이다. 이러한 주요 원인은 집약적인 대규모 생산방식과 고밀도 사육, 약제의 과다사용, 사료원료의 화학 처리제 사용 증가 그리고 가공사료의 증가 등이 있다. 산업동물에서 질병을 예방하지 못하거나 질병에 대한 저항성이 낮아질 경우 축산 농가나 산업체에서는 생산성 및 경제성에서 큰 피해를 입을 것이다. 지금까지 축산 농가나 산업체에서 질병에 대한 저항성을 높이기 위해 항생제

혹은 백신 요법 등 다양한 노력들이 시도되고 있으나, 그 효과는 미미한 실정이다. 그 여파로 국내 축산업은 생산성 저하 및 소규모 축산농가의 몰락 등의 많은 문제점을 가져왔다. 결국 축산업 영역에서 장기적으로 개발되어야 할 부분으로는 항생제 대체제 개발, 면역 증강제 개발 과 기능성 첨가제 및 대사 촉진제 개발 등이 될 것이다. 그러한 개발들이 산업동물의 증체율 향상, 폐사율 감소 및 치료비용 감소 등으로 직접 축산 농가 및 산업체의 생산성 증대에 도움을 줄 것이기 때문이다.

또한 산삼 배양액에는 사포닌 외에 다양한 활성물질들이 포함되어있으며, 산업동물에 급여할 경우 축산물의 생체 주요 장기에 축적되거나 혹은 생체 내에서 단백질들의 활성을 변화시켜 다양한 생리적 변화를 가져올 것이다. 이외에도 항생제를 대체하는 환경친화형 사료첨가제를 활용한 무투약 축산물의 생산으로 소비자들이 원하는 고품질 축산물 개발을 위하여 본 연구는 필수적이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명

육계, 계란 그리고 성장후기 비육돈에 산삼 배양액을 일정기간 급여후에 축산물 고품질화를 위한 인자들을 조사 분석한다. 축산물의 고품질화를 위한 무기물, 단백질, 조지방, 조회분등의 일반성분, 축산물의 물리화학적인 특성 (sharing force, hardness, gumminess etc), 이화학적 특성(지방산 등)을 분석하여 산삼 배양액의 효능을 검증한다.

2. 산업동물의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명

산삼 배양액을 급여한 육계, 산란계 그리고 자돈에서 생산성을 조사한다. 생산성에 대한 척도로서 증체율, 사료 요구율, 균일도 등을 측정하고 폐사율 등 다양한 면역, 혈액의 성상을 분석하여 생산성에 미치는 산삼배양액의 영향

을 검증한다.

3. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 동물의 조직별 단백질 발현 양상 분석

산삼 배양액을 급여한 육계와 자돈의 조직에서 첨단 생명공학 기법인 Proteomics를 이용하여 단백질 발현 양상을 대조군과 비교 분석한다. 2-D gel 분석 결과에서 관심 있는 단백질 spot을 분리하여 단백질을 동정한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과

산삼배양액 급여에 따른 닭고기와 계란, 돈육의 품질에 미치는 효과를 규명하였다. 본 연구 결과로서 대조군과 산삼배양액 투여군의 가슴살을 이용한 일반성분 분석 결과 조회분(Crude Ash) 함량의 증가를 보였으며 이는 계란의 난각형성에 영향을 미쳐, 난각 두께가 대조군에 비하여 산삼배양액 투여군에서 현저한 증가를 보였다. 이러한 난각 강도 및 두께의 증가는 계란의 이동시 발생할 수 있는 난각 균열을 감소시키고, 미생물의 침입을 방어할 수 있으므로, 계란의 보존성 및 상품성을 높여 계란의 품질을 높여 줄 수 있을 것이며 생산성 향상에 도움을 줄 것으로 판단된다.. 또한 산삼배양액 투여군 조직의 pH는 대조군에 비해 유의성 있는 감소 경향을 보였으며, 이는 육제품에서 미생물의 번식을 억제하고 보존이나 내구성을 강화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 산삼 배양액을 급여한 자돈과 대조군의 근육 내 일반 성분을 분석한 결과 나트륨이나 칼슘의 함량이 유의적으로 증가하였는데 이러한 미량원소는 대사 및 기타 생리적 작용에 필수적인 무기물이다. 또한 콜레스테롤의 수치도 유의적으로 감소하였는데 콜레스테롤은 인지질과 함께 세포의 막계를 구성하는 주요성분이지만 콜레스테롤 수치가 높아지면 혈액속의 지방이 증가되면서 동맥경화가 진행되어 중풍이나 심장병 같은 성인병을 일으키기 쉽다. 또한 산삼 배양액 급여

로 자돈의 근육 내 필수 지방산인 linolenic acid의 함량이 증가하였으며, EPA(eicosapentaenoic acid)와 DHA(docosahexaenoic acid)의 함량이 유의성 있게 증가하였다. Linolenic acid는 혈압, 혈당치 및 혈중 콜레스테롤 농도를 조절하며 비만증 예방, 노화 예방 및 피부 건강 유지의 효과가 있으며, 또한 EPA는 혈액의 흐름을 방해하는 나쁜 콜레스테롤이나 지방을 제거하는 기능을 하고 동맥경화, 심근 경색 및 뇌혈전등의 성인병을 예방하며, DHA는 뇌의 기능을 활발하게 하며 암의 증식을 억제해 암을 예방하고, 동맥경화에 근거하는 순환기계 질환을 예방하는 효과를 나타낸다. 이상의 결과로 산삼배양액 급여에 따른 돈육 내 성분 변화는 성인병을 예방하는 저콜레스테롤 돈육의 생산과 풍부한 미네랄과 DHA의 증가에 따른 성장기 어린이의 발육에 좋은 돈육 생산에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

2. 산업동물의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과

산삼배양액 투여군과 대조군에서 닭과 자돈의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과를 규명하였다. 그 결과 산삼배양액 투여된 육계에서의 폐사율이 대조군에 비해서 현저하게 감소되어 산삼배양액 투여로 인해 질병에 대한 저항성이 현저히 높아졌음을 확인할 수 있었고, 혈액의 정상 분석 결과 산삼 배양액 투여군의 혈청에서 칼슘의 양이 증가하였으며 이는 산삼배양액이 실험 동물의 골격 및 난각 형성에 영향을 미쳐, 난각 두께의 증가를 가져온 것으로 생각된다. 또한 산삼배양액 투여군의 혈청에서 인(Pi)의 양이 증가하였으며 이는 골격 형성 및 발육에 영향을 줄 것으로 생각된다. 산삼 배양액 투여로 인한 혈청 중 칼륨의 양 증가가 나타났으며 이는 체액의 항상성 유지 및 발육 촉진에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 또한 자돈에서 4주 동안 산삼배양액을 급여한 군의 증체량을 조사한 결과 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였고, 일일 증체량도 산삼배양액 급여군이 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 혈액 내 조성의 변화를 조사한 결과 칼슘의 양과 혈장 내 단백질 중 면역에 관련된 글로불린이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 칼슘(Ca^{2+})은 골격의 형성과 유지를 위해 매우

중요한 역할을 하며 또한 혈액 응고에 필수적인 요소이다. 또한 혈장중의 모든 감마글로불린과 알파 및 베타글로불린의 일부는 항원에 대한 항체를 형성하여 체액성 면역의 주체가 된다. 이와같이 자돈의 증체량 증가와 혈청 내 칼슘의 농도 증가는 이유 자돈의 골격형성 및 발육촉진에 영향을 끼쳐 생산성 증대에 도움을 줄 것으로 생각되며, 면역글로불린의 증가는 이유자돈의 면역력 강화에 따른 질병 저항성의 증가에 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다.

3. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 동물의 조직별 단백질 발현 양상

산삼배양액 투여군과 대조군의 조직별 단백질 발현 양상을 분석하기 위하여 이차원 전기영동을 실시하고 그 결과를 이미지 분석하여 target protein을 MALDI-TOF 및 ESI-MS/MS (Q-TOF2, Micromass사)를 이용하여 분석하였다. 육계는 가슴살과 다리살을 시료로 이용하였으며 돈육은 등최장근 (*longissimus dorsi muscle*)에서 시료를 채취하여 분석하였다. 이차원 전기영동 및 단백질 분석을 통하여 육계에서는 10가지 단백질의 발현량이 현저히 변화되었음을 확인하였다. 동정된 단백질 중 Troponin-T, Alpha-actin 그리고 Pyruvate kinase 등은 육질의 고급화를 위한 필수 단백질로서의 기능과 근육 내 에너지 생성의 필수 요소로서 체내에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀져 있어 산삼배양액 투여군의 육질이 대조군에 비해 고급화 될 것으로 사료된다. 또한 자돈에서는 heat shock protein 90-alpha, myosin binding protein 과 cofilin 2등과 같은 3종의 단백질들을 확인하였다. 이중에서 heat shock protein은 단백질 생산성과 관련하여 생성된 단백질의 활성상태로 folding하는데 중요한 역할을 하는 molecular chaperone의 일종인데 이는 정상세포의 성장에도 필요하지만 단백질을 비롯한 세포내 구성성분이 손상을 받는 스트레스 조건에서 그 발현이 증가하게 되는 단백질로 체내 방어에 필수적인 요소이다. 산삼배양액 급여에 의한 자돈 내 근육의 이 단백질의 증가는 자돈이 외부에 대한 생리적, 환경적 스트레스 상태에 노출시 스트레스에 대한 질병 발생이나 성장저하 등을 억제시켜줄 것으로 생각된다.

4. 본 연구로 인하여 지금까지 버려져 왔던 산삼 배양액을 사료첨가제로 개발하고 사료첨가제에 의한 기능성 축산물을 생산하며 가축사육에 항생제 대체제 개발에 도움을 줄 것으로 사료된다. 그러나 기능성 축산물 생산을 위한 사료첨가제 개발 및 고품질 축산물 생산을 위한 사료첨가제로서 개발은 축산농가 및 계열화 업체와 연계하여 연구해야 하고 또한 산삼배양액의 체내 대사 및 기전에 대한 추가적인 연구가 요망된다.

SUMMARY

We studied the effects of tissue culture medium of Korean wild ginseng (TCM-KWG) (*Panax ginseng*) on domestic animals and development of food additive. We investigated that the change of meat quality, productivity, immune enhancement and protein expression patterns of domestic animals after TCM-KWG treatment.

1. Effect of tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) (*Panax ginseng*) on meat quality in domestic animals.

We investigated that TCM-KWG treatment show some effect a quality of chicken, egg and pig. The result of general composition analysis is increased crude ash. It is a good effect upon formation of eggshell, and it is increased thickness of eggshell in TCM-KWG treatment than control. This strength of eggshell and thickness increment is decreased eggshell rupture that have broken out by movement of egg. It have defence invasion of microbe, therefore TCM-KWG treatment is increased quality of egg because the preservation and quality is improved, and it is judged advantage of quality. Also the pH of organ group that be treated with TCM-KWG tend to decrease significantly than control. It's supposed to intensify persistence or storage and suppress increase of microbes. As the result, the content of natrium and calcium that are essential mineral for metabolism and other physiological function increase significantly. Also the level of cholesterol decreases significantly. The cholesterol is a principal component of cell membrane system. But, if the cholesterol level is high, the fat in blood increase so that arteriosclerosis is advanced. It's easy to

cause paralysis, heart disease and so on. TCM-KWG treatment increase linolenic acid , essential fatty acids in pig muscle. Also EPA & DHA are increased significantly. Linolenic acid is controled blood pressure, blood sugar and cholesterol concentration in blood. It is effected fatness prevention, aging prevention and maintain skin health. EPA is removed bad cholesterol and lipid that disturb blood stream. It is prevented the arteries harden, myocardial infarction, cerebral thrombosis. DHA is activated brain's function, prevented cancer disease by disturb cancer's increasing and effect circulation system disease prevent to the arteries harden. In result, TCM-KWG treatment will be produce good quality pig. It is prevented adult disease and good effected children's growth.

2. Effect of tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) (Panax ginseng) on productivity in domestic animals.

We investigated that TCM-KWG treatment show some effect a productivity of a chickens and pigs. TCM-KWG treatment decreased mortality compared with control. As result, we showed that TCM-KWG treatment considerable elevated the resistant on disease of chicken. Also, TCM-KWG treatment increase calcium level in serum of chicken. As this result, TCM-KWG treatment consider will have increment of egg shell thickness on impact of skeleton and eggshell formation. TCM-KWG treatment increases quantity of Pi and Ca in the serum. Pi is considered to giving influence to frame formation and growth. Calcium affect promoting growth as well as preserving the homeostasis of body fluid. Also, after 4 weeks, we investigated weight gain of a pig. A day weight gain more increase a pig which was fed TCM-KWG. Also, calcium and globulin concerning immunity in serum increased. Calcium is very important function of skeleton formation and maintenance, essential factor of blood coagulation. Alpha, beta and gamma- globulin play the important role of humoral immune by the formed antibody on antigen. As this result, Increase weight gain and calcium concentration in serum of a pig may be good productivity increment on a impact of skeleton formation and accelerate the growth of a pig. Also, immuno-globulin increment consider will have many effect the increment of disease resistant on immunity enhancement.

3. Protein expression pattern and identity of tissue on tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) (Panax ginseng) use Proteomics.

Proteomics is the term used for the analysis of all proteins present in a cell or tissue. Its main purpose is to identify proteins and establish their function. We investigated the protein expression pattern and identity in chickens and pigs fed with the tissue culture medium waste after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) (Panax ginseng). Two groups (n=60/group) of day old broiler chickens and a week old pigs (two groups ; n=15/group) were administered with 0 (control) and 0.8% (treatment) TCM-KWG through drinking water. After 4-5 weeks, we examined the protein expression pattern of *fibularis longus* and *superficial pectoral* muscle in chickens and *longissimus dorsi* muscle in pigs. We used the two-dimensional electrophoresis(2-DE) for analyzing the protein expression. Protein isolated from muscle were separated by 12% poly-acrylamide gel and then were detected by coomassie blue staining. We identified 10 proteins (desmin, myosin light chain 1, heat shock 25 kDa protein, collapsin response mediator protein-2A, alpha enolase , vimentin, actin alpha 1, my023 protein, pyruvate kinase and troponin T) by the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) in chickens. Also, We identified 3 protein (Heat shock protein, Myosin binding protein and cofilin 2) by ESI-MS/MS (Q-TOF2) in pigs. In conclusion, TCM-KWG treatment was thought to increase troponin T and actin alpha 1 which has relevance to meat color and drip loss in chickens. Also, TCM-KWG treatment reduced disease outbreak and growth lower as physiological and environment stress state in pigs.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research project	
1. Necessity of research project	
1) TCM-KWG	
2) Waste TCM-KWG application	
3) Industrial animal's productivity increment	
4) A high quality livestock's development	
2. A prospect	
3. Propriety of technical introduction	
Chapter 2. Current status of technical developments at home and abroad ...	
Chapter 3. Research topics and results	
1. Research objects and contents	
1) Effect of tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) on meat quality in domestic animals	
2) Effect of tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) on productivity in domestic animals.	
3) Protein expression pattern and identity of tissue on tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) use Proteomics.	
2. Research objects and contents(Each year)	
3. Research methods and designs	
1) Laboratory animals and TCM-KWG treatment method	
2) A head of investigation and hematoscopy	

① Blood gathering and hematology	
② Productivity and outbreak of disease	
③ Livestock's quality test	
4. Research topics and results	
Section 1. Effect of Tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) on meat quality in domestic animals	
1) General component analysis	
① General component analysis of chicken	
② General component analysis of pig	
2) Physicochemistry component analysis	
① Physicochemistry component analysis of chicken	
② Physicochemistry component analysis of pig	
3) Physicochemistry properties	
① Physicochemistry properties of chicken	
② Physicochemistry properties of pig	
4) Quality analysis of egg	
Section 2. Effect of tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) on productivity in domestic animals	
1) Productivity effect	
① Productivity and NDV titer of chicken	
② Productivity of pig	
2) Mortality and outbreak of disease	
① Challenge test	
② Mortality and outbreak of disease in pig	
3) Productivity of layer	
4) Blood component analysis	
① Blood component analysis of chicken	

② Blood component analysis of pig	
Section 3 : Protein expression pattern and identity of tissue on tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) use Proteomics.	
1) Protein expression pattern analysis of chicken	
① 2-DE (2-dimensional electrophoresis analysis)	
② Image analysis	
③ MALDI-TOF analysis	
2) Protein expression pattern analysis of pig	
① 2-DE (2-dimensional electrophoresis analysis)	
② Image analysis	
③ Protein identification	
Chapter 4. Goal achievement and impacts on related fields	
Section 1. Effect of Tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) on meat quality in domestic animals	
Section 2. Effect of tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) on productivity in domestic animals	
Section 3 : Protein expression pattern and identity of tissue on tissue culture medium after harvest of Korean wild ginseng (TCM-KWG) use Proteomics.	
Chapter 5. Application scheme of research projects	
Chapter 6. Research information from abroad in researching	
Chapter 7. References	

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	
제 1 절 연구개발의 필요성	
1. 산삼배양액	
2. 폐기되는 산삼배양액의 활용	
3. 산업동물의 생산성 증대	
4. 고품질 축산물 개발	
제 2 절 앞으로의 전망	
제 3 절 기술도입의 타당성	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절 연구개발 목표와 내용	
1. 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	
2. 산업동물의 생산성에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	
3. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 동물의 조직별 단백질 발현 양상 분석	
제 2 절 연차별 연구개발 목표와 내용	
제 3 절 연구개발 방법 및 설계	
1. 실험동물 및 산삼배양액 급여 방법	
2. 조사항목 및 혈액학적 검사	
가. 혈액채취 및 혈액학적 검사	
나. 생산성 및 질병 발생률검정	
다. 축산물 품질 평가	

제 4 절 연구개발 내용과 연구결과	
제 1 세부과제 : 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	
1. 일반 성분 분석	
가. 계육의 일반 성분 분석	
나. 돈육의 일반 성분 분석	
2. 물리 화학적인 성상 분석	
가. 계육의 물리 화학적인 성상 분석	
나. 돈육의 물리 화학적인 성상 분석	
3. 이화학적 특성	
가. 계육의 이화학적 특성	
나. 돈육의 이화학적 특성	
4. 계란의 품질 분석	
제 2 세부과제 : 산업동물의 생산성에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	
1. 생산성에 미치는 효과	
가. 육계의 생산성 및 백신 항체가 발생을	
나. 이유자돈의 생산성	
2. 폐사율 및 질병발생률	
가. Challenge Test	
나. 이유자돈의 폐사율 및 질병 발생을	
3. 산란계의 생산성	
4. 혈액의 성상 분석	
가. 육계의 혈액 성상 분석	
나. 자돈의 혈액의 성상 분석	
제 3 세부과제 : Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여로 축산물의 조직별 단백질 발현 양상 분석	
1. 계육의 단백질 발현 양상 분석	
가. 산삼배양액 투여군과 대조군의 조직별 이차원 전기영동	

나. Image analysis	
다. MALDI-TOF 분석 결과	
2. 돈육의 단백질 발현 양상 분석	
가. 산삼배양액 투여군과 대조군의 조직별 이차원 전기영동	
나. Image analysis	
다. Protein identification	
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
제 1 절 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	
1. 닭고기와 계란의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 평가	
2. 돈육의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 평가	
제 2 절 산업동물의 생산성에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	
1. 닭의 생산성에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	
2. 자돈의 생산성에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	
제 3 절 Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 동물의 조직별 단백질 발현 양상 분석	
1. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 닭의 조직별 단백질 발현 양상 분석	
2. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 자돈의 조직별 단백질 발현 양상 분석	
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	
제 7 장 참고문헌	

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 산삼 배양액

희귀식물을 대량 생산하는 첨단 생명공학기술을 응용하여 산삼을 실험실에서 조직배양 시키는 기술이 최근 국내 연구자들에 의해 개발되었다. 세계적으로 뛰어난 약효를 인정받고 있는 특수 식물들의 실험실적 조직배양 기술인 점으로 보아 뛰어난 결과라 하지 않을 수 없다. 진단용 산삼 염기서열을 만들어 산삼과 인삼을 구별하면서부터 시작된 산삼 연구팀은 이를 바탕으로 산삼 잔뿌리를 간편하게 배양할 수 있는 방법을 개발한 것이다. 산삼 배양액이란 조직배양을 통해 실험실에서 배양시킨 산삼을 분리하고 남은 배양액을 의미한다.



※ 산삼의 실험실적 조직배양 system

2. 폐기되는 산삼배양액의 활용

(주)이엔티에서는 앞에서 언급된 산삼 연구팀과 전략적 제휴를 통해 산삼을 증식시키고 남은 산삼 배양액을 다양한 목적으로 이용할 수 있게 되었다. 지금까지는 버려져 왔던 폐기물로서의 산삼 배양액을 이용하여 축산업의 사료첨가제로서 활용한다면 질병 예방 및 고품질 축산물의 생산에 기여할 것이다. 산삼 배양액에는 사포닌 성분외에 많은 성분들이 다량 함유되어 있음이 발견되었다. 사포닌 성분의 인체에 대한 효능과 다양한 작용들은 이미 인삼 등의 연구에서 잘 밝혀져 있다. 면역기능 증강작용, 암세포 증식 억제작용, 항염증작용 그리고 단백질 합성 촉진작용 등이 바로 그것이다. 따라서 산삼 배양액을 활용한 다양한 연구개발이 절실히 필요한 실정이다.

3. 산업동물의 생산성 증대

산업동물 생산에서 가장 큰 문제점 중에 하나는 면역력이 저하되고 있다는 사실이다. 이러한 주요 원인은 집약적인 대규모 생산방식과 고밀도 사육, 약제의 과다사용, 사료원료의 화학 처리제 사용 증가 그리고 가공사료의 증가 등이 있다. 산업동물에서 질병을 예방하지 못하거나 질병에 대한 저항성이 낮아질 경우 축산 농가나 산업체에서는 생산성 및 경제성에서 큰 피해를 입을 것이다. 지금까지 축산 농가나 산업체에서 질병에 대한 저항성을 높이기 위해 항생제 혹은 백신 요법 등 다양한 노력들이 시도되고 있으나, 그 효과는 미미한 실정이다. 그 여파로 국내 축산업은 생산성 저하 및 소규모 축산농가의 몰락 등의 많은 문제점을 가져왔다. 결국 축산업 영역에서 장기적으로 개발되어야 할 부분으로는 항생제 대체제 개발, 면역 증강제 개발 과 기능성 첨가제 및 대사 촉진제 개발 등이 될 것이다. 그러한 개발들이 산업동물의 증체율 향상, 폐사율 감소 및 치료비용 감소 등으로 직접 축산 농가 및 산업체의 생산성 증대에 도

움을 줄 것이기 때문이다.

4. 고품질 축산물 개발

최근 축산물 애호가들의 소비 성향은 맞춤형 축산물의 공급을 기대하고 있다. 다양한 생체 활성 물질 등이 포함되어 있거나, 자신의 기호나 생체 변화에 맞는 고품질 축산식품을 원하는 것이다. 산삼 배양액에는 사포닌 외에 다양한 활성물질들이 포함되어있으며, 산업동물에 급여할 경우 축산물의 생체 주요 장기에 축적되거나 혹은 생체 내에서 단백질들의 활성을 변화시켜 다양한 생리적 변화를 가져올 것이다. 이외에도 항생제를 대체하는 환경친화형 사료첨가제를 활용한 무투약 축산물의 생산으로 소비자들이 원하는 고품질 축산물 개발을 위하여 본 연구는 필수적이다.

제 2 절 앞으로의 전망

21세기에 들어 생명공학의 눈부신 발전으로 인하여 축산업 분야에서도 복제와 형질전환동물 등의 새로운 연구들이 시도되고 있다. 인간의 건강을 지켜 줄 수 있는 맞춤형, 주문형 축산물 시대의 도래도 멀지 않은 것 같다. 인간의 건강과 직결된 수많은 단백질들이 함유되어있는 축산물의 개발은 주문형 축산물 개발의 시발점이 될 것이다.

산삼 배양액에 대한 기초과학적 연구가 마무리된다면 미래 신약개발 및 생체 활성물질 개발 등의 국가 기반 사업에 큰 도움이 될 것이다. 또한 본 연구에서 산삼 배양액을 급여한 산업동물이 질병 저항성을 갖는 것으로 확인되면 축산업 분야에 획기적인 생산성 증대 방안이 될 것이다.

현재 인삼 및 산삼의 염기서열 분석 분석작업인 인삼게놈연구가 국가적 과제로 진행중이다. 이 작업이 완료되면, 인삼과 산삼의 조직 배양 기술이 급진적인 발전을 할 것으로 기대한다.

제 3 절 기술도입의 타당성

산삼 배양액의 산업동물에의 활용은 세계 최초로 이루어지는 연구이며, 본 연구팀은 배양액 제조와 활용 등에 관한 기술을 이미 확보하고 있는 상태이므로 기술도입과 관련된 필요성은 없을 것으로 판단된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

최근 국내 저명한 연구자들에 의하여 인삼이나 산삼 등의 조직배양이 활발한 연구 끝에 결실을 맺어 상품화 단계에까지 이르렀다. 이에 발맞추어 축산업 분야에서도 인삼의 줄기나 잎 등을 사료로 첨가하여 고품질 축산물 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 산삼 배양액에서 가장 많은 성분으로 알려져 있는 사포닌 성분의 효능과 관련된 연구 결과는 많이 발표되어 있다(Santos WR et al, Kim CS et al, de Combarieu E et al, Gosse B et al). 세포내에서 면역기능을 담당하고 있는 세망내피계 기능을 면역억제 약물 투여 등으로 저하시켜 놓은 다음 사포닌을 투여하였더니 망내계 기능이 정상으로 회복되었다는 결과(Grover AK et al, Hedman K et al)와 인삼의 면역기능 항진효능에 대한 연구결과 등은 사포닌의 면역력 향상의 기능을 보여주는 결과이다(Hu S, et al). 또한 조직의 퇴행성 변화에 중요한 역할을 하는 활성 산소종(hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide)의 유해작용을 인삼 함유 비사포닌 성분이 억제한다는 보고되었으며(Rivera E et al, Kim H et al), 이는 산소에 대한 인삼의 소진 효과에 기인한다고 했다. 그러나 아직까지 산삼 배양액을 이용한 연구결과는 보고되지 않고 있으며, 산업동물에 적용하여 효능과 효과를 검증한 결과도 전무한 상태이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 목표와 내용

1. 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명

육계, 계란 그리고 성장후기 비육돈에 산삼 배양액을 일정기간 급여후에 축산물 고품질화를 위한 인자들을 조사 분석한다. 축산물의 고품질화를 위한 무기물, 단백질, 조지방, 조회분등의 일반성분, 축산물의 물리화학적인 특성 (sharing force, hardness, gumminess etc), 이화학적 특성(지방산 등)을 분석하여 산삼 배양액의 효능을 검증한다.

2. 산업동물의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명

산삼 배양액을 급여한 육계, 산란계 그리고 자돈에서 생산성을 조사한다. 생산성에 대한 척도로서 증체율, 사료 요구율, 균일도 등을 측정하고 폐사율 등 다양한 면역, 혈액의 성상을 분석하여 생산성에 미치는 산삼배양액의 영향을 검증한다.

3. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 동물의 조직별 단백질 발현 양상 분석

산삼 배양액을 급여한 육계와 자돈의 조직에서 첨단 생명공학 기법인 Proteomics를 이용하여 단백질 발현 양상을 대조군과 비교 분석한다. 2-D gel 분석 결과에서 관심 있는 단백질 spot을 분리하여 단백질을 동정한다.

연구 과제명	연구 개발 목표	연구개발 내용
산삼배양액의 효과 규명 및 이를 이용한 사료 첨가제 개발	제 1세부과제 : 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 육의 일반성분 분석 : 실험 종료후 <ul style="list-style-type: none"> - 무기물, 단백질, 조지방, 조회분 함량 ▶ 육의 물리 화학적인 성상 분석 <ul style="list-style-type: none"> - Sharing force, hardness, cohesiveness, purge loss etc. ▶ 육의 이화학적 특성: 실험 종료시 가슴육 <ul style="list-style-type: none"> - 지방산, 아미노산 ▶ 혈액의 성상 분석 : 실험 종료시 채혈 <ul style="list-style-type: none"> - 콜레스테롤, HDL, LDL, 중성지방, 알부민등 ▶ 계란 품질 분석 : <ul style="list-style-type: none"> - 난각강도, 난각두께, 호유닛(4주단위 16주간) - 난황색, 콜레스테롤, 지방산(8주단위 16주)
	제 2세부과제 : 산업동물의 생산성에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 육의 생산성 : 0, 0.50, 1.0, 2.0 ml/ℓ 물 <ul style="list-style-type: none"> - 처리구간 증체량, 사료요구율, 사료섭취량, 주간별 측정(2차례 사양실험) ▶ 사육집단의 균일도 측정 ▶ 폐사율 및 질병발생률 조사 ▶ 백신 항체가 측정 : 2주령, 24일 백신접종 <ul style="list-style-type: none"> - ND백신 항체가 측정 ▶ 산란계의 생산성 : 0, 0.5, 1.0, 2.0ml/ℓ 물 <ul style="list-style-type: none"> - 산란율, 난중, 사료요구율(처리구당 5반복 반복당 18수 전체 360수에 4주간격 16주간 측정)
	제 3세부과제 : Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여로 축산물의 조직별 단백질 발현 양상 분석	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Proteomics를 통한 expression profile을 작성하고 대조군과 비교 분석. ▶ 2-D gel 분석과 관심 있는 단백질 spot의 분리. ▶ Sequencing과 MALDI-TOF을 이용한 단백질의 동정

제 2 절 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과
1차 년도 (2003)	<p>닭고기와 계란의 품질에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 계육의 일반성분 분석 : 실험 종료후 <ul style="list-style-type: none"> - 무기물, 단백질, 조지방, 조회분 함량 ▶ 계육의 물리 화학적인 성상 분석 <ul style="list-style-type: none"> - Sharing force, hardness, cohesiveness, purge loss etc. ▶ 계육의 이화학적 특성: 실험 종료시 가슴육 <ul style="list-style-type: none"> - 지방산, 아미노산 ▶ 계란 품질 분석 : <ul style="list-style-type: none"> - 난각강도, 난각두께, 호유닛 - 난황색, 콜레스테롤, 지방산 	
	<p>닭의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ - 처리구간 증체량, 사료요구율, 사료섭취량 ▶ 육계 사육집단의 균일도 측정 ▶ 폐사율 및 질병발생률 측정 ▶ 백신 항체가 측정 : 2주령, 24일 백신접종 <ul style="list-style-type: none"> - ND백신 항체가 측정 ▶ 산란계의 생산성 : 0, 0.5, 1.0, 2.0ml/ℓ 물 <ul style="list-style-type: none"> - 산란율, 난중, 사료요구율 ▶ 혈액의 성상 분석 : 실험 종료시 닭 채혈 <ul style="list-style-type: none"> - 콜레스테롤, HDL, LDL, 중성지방, 알부민등 	
	<p>Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 닭의 조직별 단백질 발현 양상 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Proteomics를 통한 expression profile을 작성하고 대조군과 비교 분석. ▶ 2-D gel 분석과 관심 있는 단백질 spot의 분리. ▶ Sequencing과 MALDI-TOF을 이용한 단백질의 동정 	

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
	돼지고기의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 돈육의 일반성분 분석 : 실험 종료후 <ul style="list-style-type: none"> - 무기물, 단백질, 조지방, 조회분 함량 ▶ 돈육의 물리 화학적인 성상 분석 <ul style="list-style-type: none"> - Sharing force, hardness, cohesiveness, purge loss, cooking loss etc. ▶ 돈육의 이화학적 특성: 실험 종료시 등심 <ul style="list-style-type: none"> - 지방산, 아미노산 	
2차년도 (2004)	자돈의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> ▶ - 처리구간 증체량, 사료요구율, 사료섭취량 ▶ 폐사율 및 질병발생률 측정 ▶ 처리구간의 균일도 측정 ▶ 혈액의 성상 분석 : 실험 종료시 채혈 <ul style="list-style-type: none"> - 콜레스테롤, HDL, LDL, 중성지질, 알부민등 	
	Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 자돈의 조직별 단백질 발현 양상 분석	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Proteomics를 통한 expression profile을 작성하고 대조군과 비교 분석. ▶ 2-D gel 분석과 관심 있는 단백질 spot의 분리. ▶ Sequencing과 MALDI-TOF을 이용한 단백질의 동정 	

제 3 절 연구개발 방법 및 설계

1. 실험동물 및 산삼배양액 급여 방법

산란계와 육계는 전북대학내의 부속농장에서 사양실험을 실시하였으며, 산삼배양액의 수준은 각 시험동물의 음수에 0, 2, 4, 8, 16 그리고 32 ml/ℓ 물의 비율로 희석 자유 급여하였다. 2차 실험에서는 8ml/ℓ의 산삼 배양액을 희석하여 공급하였으며, 급여 시기는 다음의 표와 같이 급여하였다.

Table 1. Experimental period design for chicks

구 분	닭		
	육계1	육계2	산란계
급여시점	1일령	1일령 혹은 3주령	17-18주령
급여기간	5주	1일령은 3주와 5주 3주령은 2주	16주



Fig. 1. Photograph picture of experimental site

자돈은 전라북도 남원시 운봉의 2개 농가에서 각각 60마리씩 총 120마리로 사양실험을 실시하였으며, 산삼배양액의 수준은 각 급여군별 돈사에 물탱크를 설치하여 시험동물의 음수에 0, 4, 8 그리고 16 ml/ℓ 물의 비율로 희석하여 자유 급여하였다. 산삼배양액의 급여 시기는 자돈 이유 후부터 농가마다 각각 4주 동안 실시하였다.

Table 2. Experimental period design for swines

산삼배양액 (ml/L)	군당자돈수(2groups)		군당 실험자돈수	총 실험자돈수
	농장1	농장2		
0	15	15	30	
4	15	15	30	120마리
8	15	15	30	(각 농장별 60마리)
16	15	15	30	



Fig. 2. Photograph picture of experimental site

2. 조사항목 및 측정 방법

가. 혈액채취 및 혈액학적 검사

닭, 돼지 및 소에서 혈액을 채혈할 것이고 채혈한 혈액은 EDTA bottle 및 혈청 분리용 vacutainer에 각각 분주하여 실험실로 옮긴후 원심분리기를 이용 원심분리를 실시할 것이며 분석전까지 ependorf tube에 주입하여 냉장고에 보관할 것이다. 시료로 채취한 후 혈액성분의 변화를 보기 위하여 혈액내 pH, 적혈구의 Hematocrit치 및 Hemoglobin치, 백혈구에서는 총수 및 감별진단을 할 것이며 이들 혈청에서 광물질 (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , K^+ 및 Mg^{2+}), 혈장 단백질 (albumin, globulin등), 혈장의 포도당 농도 및 효소 (aspartate aminotransferase 및 gamma-glutamyl transferase) 등을 검사하여 대조군과 실험군간의 차이를 알아볼 것이다. 구체적으로 살펴보면, RBC, Hb (Hemoglobin), MCH (Mean corpuscular hemoglobin), MCV (Mean corpuscular volume), MCHC (Mean corpuscular Hemoglobin concentration)는 자동 혈액분석기 (Hemavet)를 이용하여 측정할 것이며 PCV는 Microhematocrit 법을 이용할 것이다. 혈액에서 백혈구의 수는 hemocytometer를 이용하여 측정할 것이며 감별 계산은 Diff-Quick 법을 이용 실시할 것이다. 혈액 화학치 및 제 4위액의 화학치 검사는 자동 혈액화학 분석기 (Fuji, Japan)를 이용하여 AST, ALT, albumin, globulin의 각각 plate에 100 μl 의 sample을 점적하여 이를 관독할 것이다. 아울러 전해질 분석기 (Nova 10 plus, Japan)를 이용 이들 표본에서 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 및 Pi치를 측정할 것이다.

나. 생산성 및 질병 발생률검정

닭, 돼지, 소의 각 성장 단계에서 대조군과 실험군 간의 체중은 개시시와 그 후 종료시까지 주기적으로 측정하여 조사한다. 육계는 주간별 증체량, 사료 섭취량, 사료요구율을 측정하며, 산란계는 산란개시후 산란율, 사료섭취량, 사료요구율을 4주단위로 16주간 실행한다. 돼지는 어린돼지에서 성장능력에 미치

는 영향을 구명하고자 이유후에 약 10kg의 이유자돈을 이용하여 8-12주간 증체량, 사료섭취량, 사료요구율을 4주단위로 측정한다.

다. 축산물 품질 평가

계육은 실험 종료후 처리구별로 가슴육을 채취하여 아래와 같이 실행한다. 계란의 품질은 난각강도, 난각두께, 호유닛, 난황색도를 FHK(Japan, Tokyo)를 이용하여 측정한다. 돼지와 소에서는 사양 시험 종료후 24시간 절식 시켜 절식 체중을 측정하고 도축장으로 이동하여 도축 즉시 체중을 측정하고 도살한 다음 도체를 2분할하여 1일간 5℃ 내외로 냉장시킨다. 이외에도 한국 도체등급기준에 따라 도체 등급을 평가한다. 돼지에서는 등심부분에서 소는 도체의 제 13늑골과 제 1요추 사이의 2.5 kg을 시료로 채취하여 아래와 같이 조사한다.

1) 일반성분(Proximate analysis)

조지방(Crude fat), 조단백(Crude protein), 수분(Moisture), 조회분(Crude ash)등은 AOAC법에 의하여 실행한다.

2) pH 측정

시료 10g에 증류수 20ml을 가하여 세절혼합한 후 pH-meter Orion 420A를 이용하여 시료의 pH를 측정한다.

3) 조직감(Texture)

시료를 4cm × 5cm × 6cm 크기로 절단하고 75℃의 열탕기에서 시료의 중심온도가 70℃에 달한 후 30분간 가열하여 샘플 채취 틀에 넣어 1cm × 2cm × 2cm의 크기로 만든 후 FUDOH-Rheometer에서 경도(Hardness), 응집성(Cohesiveness), 늘어짐성(Springness), 저작성(Chewiness) 및 부서짐성(Brittleness), 절단력(Shearing Force)등을 측정한다.

4) 조리감량(Cooking loss)

시료를 2cm × 2cm × 2cm의 크기로 잘라 무게를 측정하고(A), 진공포장을 하여 75℃의 열탕기에서 시료의 중심온도가 70℃에 달한 후 30분간 가열한 후 무게를 측정하여(B) 산출한다.

$$\text{Cooking loss(\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

5) 육즙손실(Purge loss)

시료의 저장시에 발생하는 삼출액으로 purge loss는 포장을 개봉하기 전에 무게를 측정하고(A), 포장을 개봉 후 포장재의 무게를 측정하고(B), 포장 내에 유출된 드립을 제거한 후 무게를 측정(C)하여 산출한다.

$$\text{Purge loss(\%)} = \frac{(A-B-C)}{(A-B)} \times 100$$

6) 육색 (Color value)

육색은 New Mexico State University standards의 방법을 이용하며(Ray 등, 1977) 시료의 표면을 colorimeter(Tristimulus Colorimeter, SC-80)에 의해 명도(Lightness)를 나타내는 L값, 적색도(Redness)를 나타내는 a-값, 그리고 황색도(Yellowness)를 나타내는 b-값을 각각 측정한다.

7). Myoglobin(Mb)의 추출

Mb의 추출은 75% acetone - 0.7% HCl, Acetone-HCl 추출 정량법(Hornsey, 1956)을 사용하였다. 추출액은 동양여과지 NO. 6 으로 갈색시험관에 여과하고, 여과액은 분광 광도계 383nm에서 측정하였다. Mb의 함량은 mg%로 나타낸다.

8). 건물량의 측정

채취된 샘플을 냉동 후 5g씩 채취하여 freeze dryer(model No. MCFD5508)

를 사용하여 -50°C 에서 24시간 동결건조한다. 샘플은 수분이 원활하게 빠져나가도록 하기 위하여 가아제천을 사용하였으며, 24시간후에 샘플을 꺼내어 Mettler PM420을 이용하여 건물량을 측정한다.

9) 축산물의 지방산

지방산 조성 분석은 시료를 0.5g 취한 후 Park과 Goins(1994)의 방법에 의해서 methylation한다. 시료에 Methanol : Benzen(4:1,v/v) 2ml과 acetyl chloride $200\mu\text{l}$ 를 가한 후 100°C 의 heating block에서 1시간 동안 가열한다. 이를 실온에 충분히 방치한 다음 hexane 1ml과 6% potassium carbonate 5ml를 가하고 원심분리기를 이용하여 3,000rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상등액 $0.5\mu\text{l}$ 를 취하여 gas chromatography(Shimadzu GA-17A)에 injection하며 분석조건은 다음과 같다. Column의 초기온도는 180°C 에서 시작하여 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 230°C 까지 온도를 상승시켜 2분간 유지한다. 이때 injector, detector(FID)의 온도는 각각 240°C , 260°C 로 하며, 지방산은 표준품과 retention time을 비교하여 확인하며 함량은 백분율로 환산한다.

10) 축산물의 콜레스테롤

콜레스테롤 분석은 King 등(1998)의 방법을 기초로 한다. 시료에 내부 표준물질(5α -cholestane)을 첨가한 후, 5mL의 50% KOH(aq.)와 22mL의 ethanol을 넣고 23°C 에서 6시간 동안 검화시킨다. 검화가 끝난 용액을 50mL의 추출용매로 3회 반복 추출한 후 TMS 유도체를 만든 후 gas chromatography로 분석한다. 콜레스테롤은 capillary column($30\text{m}\times 0.25\text{mm}$ I.D.; Omegawax 250)으로 장착된 GC(Shimadzu GC-17A)를 사용하여 다음과 같은 조건으로 분석한다. Column의 초기온도는 250°C 에서 시작하여 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 280°C 까지 온도를 상승시키며 injector, detector(FID)의 온도는 각각 270°C , 300°C 로 하고, 콜레스테롤은 표준품과 retention time을 비교하여 확인하며, 함량은 내부표준물질 5α -cholestane을 이용하여 계산한다.

11). Proteomics 분석을 위한 시료 처리 및 분석방법

시료를 녹이는 것은 proteomics에 있어서의 첫 단계로서 재현성 있고, 의미 있는 결과를 얻는데 있어서 가장 중요한 단계이다. 대체적으로 시료취득을 위하여서는 detergent lysis와 Sonication을 병행하여 단백질을 분리하고 정량함.

가) 2-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE)

2차원 공간에 단백질의 고유한 특성인 분자량과 전하량의 차이를 이용해서 세포 내 전체 단백질들을 펼쳐 보이기 위하여, pI3에서 pI10까지 등전점의 변화를 주어 전기영동을 실시하여 비교 분석함. 첫 번째로 IPGphor Isoelectric Focusing (IEF) System을 이용하여 IEF를 실시하고, 다시 SDS-PAGE Electrophoresis를 실시함.

나) Staining

2-D gel의 염색은 proteomics에서의 실험 결과를 해석하는데 중요한 것으로 2차원 공간에 단백질들을 가시화하는 단계이므로 detection하는 감도가 높아야 할뿐 아니라 정량에 대해 linearity가 있어야 하며, mass spectrometry 혹은 Edman sequencing과 같은 downstream 분석이 용이한 방법이어야 하므로 Silver staining을 실시함.

다) Image Acquisition and analysis

2-D gel를 분석하기 위해 먼저 imaging system을 이용해 gel spot을 digital form으로 얻은 후, 이를 analysis software를 이용해서 분석함. 얻어진 2-D image를 software를 이용해서 비교 및 분석함. Ssoftware로는 100개의 gel image를 동시에 분석할 수 있는 2D Elite site licence software를 이용하여 분석함. 분석한 2D-패턴은 SwissProt (<http://us.expasy.org/ch2d/>) 등의 데이터베이스 등을 통하여 비교 분석함.

라) Protein Excision and identification

2-D gel을 분석한 후, 관심 있는 단백질의 동정을 위해 관련 spot을 잘라냄. Proteomics의 마지막 단계로서 전기장과 자기장을 이용한 고분해능 질량분석기인 MALDI-TOF나 Tandem Mass Spectrometer(JMS HX-110/110A, JEOL, Japan)를 이용하여 단백질질의 구조분석을 실시함(기초과학지원연구소 활용).

마) 아미노산 염기서열 분석

분석결과 의미있는 단백질에 대해서는 아미노산 염기서열분석을 의뢰하여 분석한 후 GenBank 등의 데이터베이스를 통해 비교 분석함.

제 4 절 연구개발 내용과 연구결과

제 1 세부과제 : 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명

1. 일반 성분 분석

가. 계육의 일반 성분 분석

Table 3은 산삼 배양액을 급여한 육계 가슴육의 일반 성분을 나타내었다. 가슴육의 수분 함량은 73.83-74.81% 사이로 나타났으며, 처리구간 차이는 없었다. 조단백질 함량은 산삼 배양액과 대조구 사이에 차이가 없었으며, 조지방의 함량에 있어서도 대조구의 1.47%에 비하여 산삼 배양액 처리구가 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 조회분의 함량은 산삼 배양액 32ml/L 급여구가 다른 처리구에 비하여 유의적으로 증가하였다(Fig. 3). 산삼 배양액 급여 실험에서 조회분의 함량이 유의적으로 증가하였는데 조회분(Crude Ash)은 체내에 존재하는 무기물로서 대사 및 기타 생리적 작용에 필수적인 요소이다. 가금에서의 무기물은 골격 및 난각 형성, 삼투압이나 항상성 유지에 필요하고, 호르몬이나 효소, 보호소, 세포 등의 구성 성분으로서 매우 중요하다.

Table 3. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on chemical composition of breast meat.

Treatments (ml/L)	Moisture(%)	C. Protein(%)	C. Fat(%)	C. Ash(%)
0	73.95	22.84	1.47	1.25 ^b
2	74.81	22.61	1.30	1.29 ^b
4	73.86	22.90	1.35	1.20 ^b
8	74.59	22.78	1.35	1.28 ^b
16	74.25	22.86	1.42	1.30 ^b
32	73.83	23.34	1.32	1.51 ^a
PSE	0.13	0.11	0.07	0.02

^{a,b} Means with different superscripts within a row differ significantly(P<0.05)

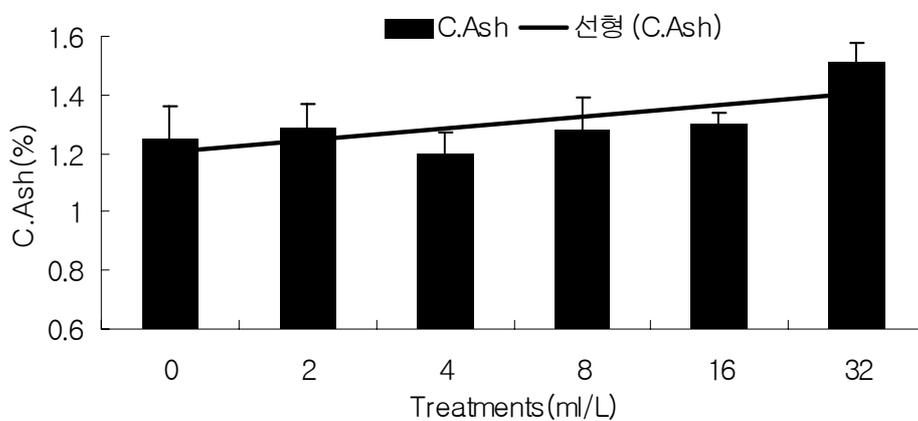


Fig. 3. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on C.Ash of breast meat

나. 돈육의 일반 성분 분석

산삼배양액의 급여가 돈육의 일반 성분에 어떤 변화를 보이는지 조사하기 위하여 산삼배양액 급여 종료 후 자돈을 즉시 도살 처리하여 대조군과 급여군(16ml/L)의 등최장근(*longissimus dorsi muscle*)에서 근육을 채취하여 일반 성분을 비교 분석하였다. Table 4는 산삼 배양액을 급여한 자돈과 대조군의 근육 내 일반 성분을 나타내었다. 돈육의 수분 함량은 76.12~76.54% 사이로 나타났으며, 처리구간 차이는 없었다. 조단백질 함량은 산삼 배양액 급여군이 대조군에 비해 감소하는 경향을 보이나 유의적인 차이는 보이지 않으며, 조지방의 함량에 있어서도 대조군과 산삼 배양액 처리군의 차이를 보이지 않았다. 조회분의 함량은 대조군의 1.24%에 비해 급여군에서 감소하는 경향을 보이나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 미량원소중 나트륨이나 칼슘은 산삼배양액 급여군이 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 4). 또한 돈육의 콜레스테롤은 대조군에 비해 산삼배양액 급여군의 수치가 유의성 있게 감소하는 경향을 보였다.(Fig. 5).

Table 4. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng (TCM-KWG) on chemical composition of *longissimus dorsi muscle* in pigs.

일반성분	대조군	급여군(16ml/L)
열량(kcal/100g)	105.23	99.11
탄수화물(%)	0.05	5.02
수분(%)	76.54	76.12
조회분(%)	1.24	1.09
조단백질(%)	22.86	16.18
조지방(%)	1.51	1.59
나트륨(mg/100g)	66.37	88.81
칼슘(mg/100g)	4.52	6
인(mg/100g)	242.97	230.29
칼륨(mg/100g)	386.46	346.12
마그네슘(mg/100g)	24.71	24.41
콜레스테롤(mg/100g)	93.78	90.92

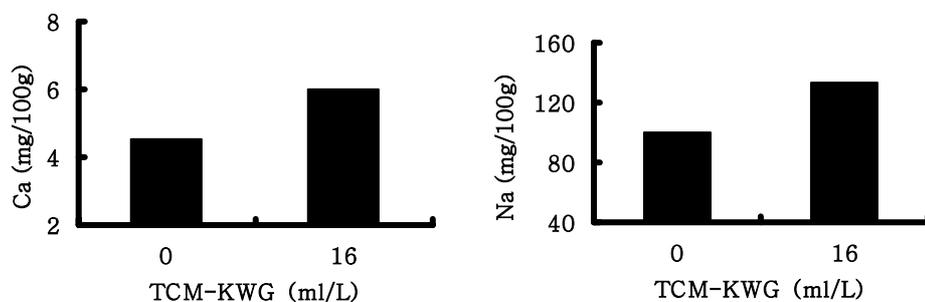


Fig. 4. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on calcium and sodium of *longissimus dorsi muscle* in pigs.

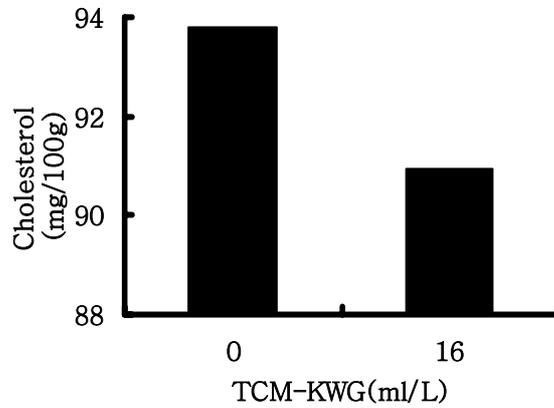


Fig. 5. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on cholesterol level of *longissimus dorsi muscle in pigs*.

산삼 배양액 급여 실험에서 나트륨이나 칼슘의 함량이 유의적으로 증가하였는데 이러한 미량원소는 체내에 존재하는 무기물로서 대사 및 기타 생리적 작용에 필수적인 요소이다. 특히 나트륨은 체액의 산, 염기의 평형유지나 삼투압 조절 등에 중요한 역할을 하며, 칼슘은 혈액응고에 필수적인 인자이며 골격의 형성과 유지에 매우 중요하다. 또한 콜레스테롤은 인지질과 함께 세포의 막계를 구성하는 주요성분이지만 콜레스테롤 수치가 높아지면 혈액속의 지방이 증가되면서 동맥경화가 진행되어 중풍이나 심장병 같은 성인병을 일으키기 쉽다.

2. 물리 화학적인 성상 분석

가. 계육의 물리 화학적인 성상 분석

Table 5에서는 산삼 배양액을 5주간 급여한 후 측정된 육계 가슴육의 pH, 육즙 손실, 조리 감량을 나타내었다. 가슴육의 pH는 대조구의 5.72에 비하여 4, 16ml/L 급여구가 유의적으로 감소하였다(Fig.6). 육즙 손실은 8ml/L 급여구가 대조구에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 조리 감량에 있어서는 산삼 배양액 급여구가 대조구에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 산삼 배양액 급여군의 가슴육의 pH가 감소하였는데, pH의 변화는 미생물의 번식이나 식육의 보존에 영향을 많이 받아서 pH가 낮을 때에는 미생물의 번식을 억제하고 식육의 보존이나 내구성을 강화시키며, pH가 높을 때에는 보수력은 높으나 미생물의 번식이 용이하며 오래된 고기로 오인하여 상품 가치가 떨어진다. 그러므로 산삼배양액 투여에 의하여 미생물 번식의 억제 및 식육의 내구성 강화를 유도할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 5. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on pH, purge loss and cooking loss of breast meat in Expt 1

Treatments(ml/L)	pH	Purge loss(%)	Cooking loss (%)
0	5.72 ^a	2.63	20.19
2	5.68 ^a	2.72	19.78
4	5.50 ^b	2.64	19.25
8	5.61 ^{ab}	1.69	19.52
16	5.52 ^b	2.16	19.95
32	5.61 ^{ab}	2.51	18.68
PSE	0.02	0.12	0.29

^{a,b} Means with different superscripts within a row differ significantly (P<0.05)

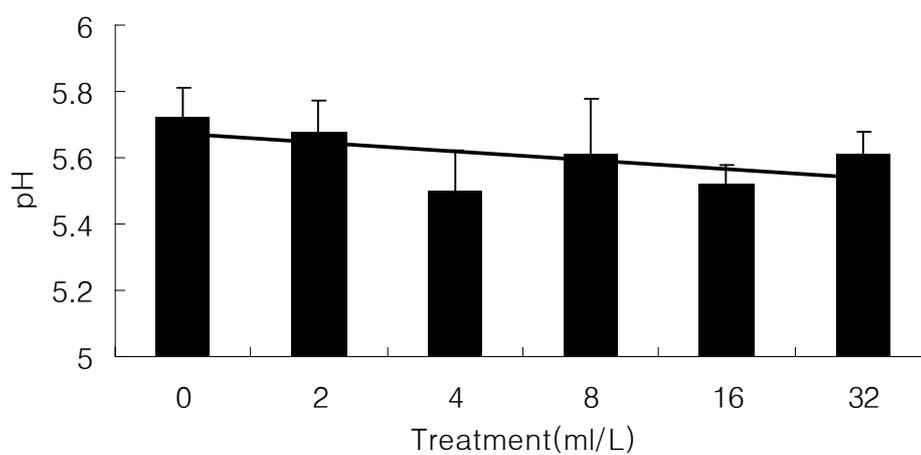


Fig. 6. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on pH of breast meat in Expt. 1

Table 6에서는 사양 전기(1-3), 후기(4-5) 및 전체(1-5) 기간 동안 산삼 배양액을 음수로 급여한 육계 가슴육의 pH, 육즙 손실, 조리 감량을 나타내었다

가슴육의 pH는 사양 전기(1-3), 후기(4-5) 및 전체(1-5) 기간 동안 산삼 배양액을 급여한 구가 대조구와 비교하여 유의적으로 감소한 것으로 나타났다 (Fig.7). 육즙 손실은 전체(1-5)기간동안 산삼 배양액을 급여한 구가 대조구에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 조리 감량에 있어서는 사양 전기(1-3)와 전체(1-5)에서 산삼 배양액을 급여한 구가 대조구에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 6. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on pH, purge loss and cooking loss of breast meat in Expt 2

Treatments (8ml/L)	pH	Purge loss(%)	Cooking loss (%)
0	5.70 ^a	2.90	14.78
Starter period	5.60 ^{ab}	3.12	12.96
Finisher period	5.54 ^b	2.84	14.91
Whole period	5.48 ^b	2.19	13.98
PSE	0.02	0.20	0.43

^{a,b} Means with the different superscripts within a column differ significantly(P<0.05)

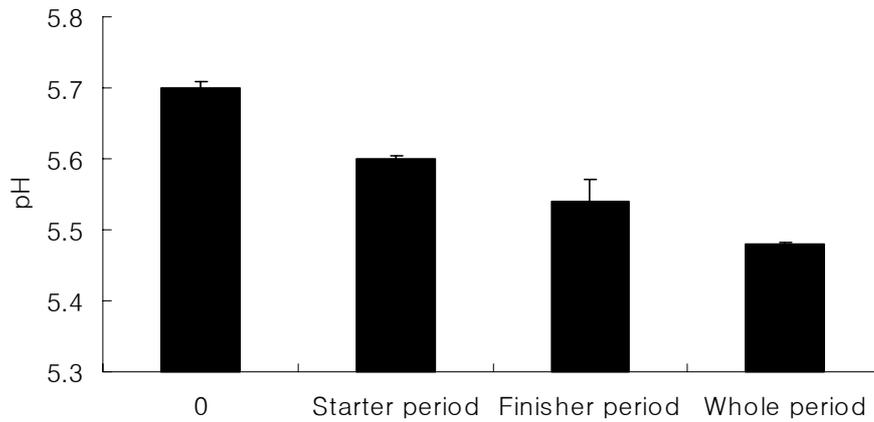


Fig. 7. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on pH of breast meat in Expt 2

산삼 배양액 급여에 따른 가슴육의 육색 변화는 Table 7에 나타내었다. 명도를 나타내는 L^* 값의 경우 산삼 배양액 급여구와 대조구 사이에서 유의적인 차이는 없었다. 적색도를 나타내는 a^* 값과 황색도를 나타내는 b^* 값 또한 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 8에서는 사양 전기(1-3), 후기(4-5) 및 전체(1-5) 기간 동안 산삼 배양액을 음수로 급여한 육계 가슴육의 육색 변화를 나타내었다

명도를 나타내는 L^* 값의 경우 산삼 배양액 급여구와 대조구 사이에서 유의적인 차이는 없었고, 적색도를 나타내는 a^* 값 또한 유의적인 차이는 없었지만 황색도를 나타내는 b^* 값은 산삼 배양액 급여구가 대조구에 비해 유의적인 차이가 보였다.

Table 7. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on color value of breast meat in Expt 1

Treatments(ml/L)	L*	a*	b*
0	46.74	3.68	3.55
2	45.79	4.75	3.02
4	45.72	3.94	3.09
8	46.05	4.18	3.47
16	46.71	3.76	2.57
32	45.51	4.28	4.04
PSE	0.27	0.21	0.15

Table 8. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on color value of breast meat in Expt 2

Treatments(8ml/L)	L*	a*	b*
0	47.45	3.03	3.08 ^b
Starter period	45.55	3.29	4.01 ^{ab}
Finisher period	45.89	3.00	4.65 ^a
Whole period	46.78	2.69	4.47 ^a
PSE	0.35	0.20	0.19

^{a,b} Means with the different superscripts within a column differ significantly (P<0.05)

산삼 배양액을 급여한 후 도계한 가슴육의 전단력 및 저작성을 측정한 결과는 Table 9에 나타내었다. Yates(1983)은 근원섬유단백질 등을 분해하는 효소에 의해서 연도가 증가한다고 하였고, Yu와 Lee(1986)은 pH가 영향을 미친다고 보고하였다. 본 시험의 결과, 전단력은 산삼 배양액 급여구와 대조구 사이에 차이가 없었다. 또한 저작성(Hardness, cohesiveness, springiness, gumminess, brittleness)도 처리구 상호간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 9. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on mechanical texture characters of breast meat in Expt 1

Treatments (ml/L)	Shearing force (kg/cm ²)	Hardness (kg/cm ²)	Cohesiveness (%)	Springiness (%)	Gumminess (g)	Brittleness (g)
0	3.43	4.80	21.35	5.34	465	32.20
2	3.09	4.42	21.32	5.02	452	30.12
4	3.67	4.96	23.38	5.86	488	34.56
8	3.10	4.67	21.21	5.18	461	31.92
16	3.57	4.86	21.45	5.44	469	32.34
32	3.36	4.74	20.13	5.08	459	30.63
PSE	0.13	0.31	1.25	0.35	46.52	3.02

Table 10에서는 사양 전기(1-3), 후기(4-5) 및 전체(1-5) 기간 동안 산삼 배양액을 음수로 급여한 후 도계한 가슴육의 전단력 및 저작성을 측정된 것을 나타내었다.

산삼 배양액 급여구와 대조구 사이의 전단력이나 저작성(Hardness, cohesiveness, springiness, gumminess, brittleness)의 차이는 상호간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 10. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on mechanical texture characters of breast meat in Expt 2

Treatments (8ml/L)	Shearing force (kg/cm ²)	Hardness (kg/cm ²)	Cohesiveness (%)	Springiness (%)	Gumminess (g)	Brittleness (g)
0	4.30	5.75	16.56	10.84	321	40.68
Starter	4.85	5.02	15.51	11.50	287	41.57
Finisher	4.12	6.97	20.38	15.53	365	67.44
Whole	4.08	4.81	18.28	10.45	335	54.04
PSE	0.17	0.36	1.56	0.86	45.1	9.01

나. 돈육의 물리 화학적인 성상 분석

산삼배양액의 급여에 따른 돈육의 물리 화학적 변화를 조사하기 위하여 산삼배양액 급여 종료 후 자돈을 즉시 도살 처리하여 대조군과 급여군(16ml/L)의 등최장근(*longissimus dorsi muscle*)에서 근육을 채취하여 샘플로 이용하였다. Table 11에서는 산삼배양액을 급여한 자돈 등최장근의 육즙 손실, 조리

감량 및 물리적인 특성을 나타내었다. 등최장근의 육즙 손실은 대조군과 비교하여 산삼배양액을 급여한 군에서와 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 조리 감량에 있어서도 급여군과의 차이를 보이지 않았다. 또한 등최장근의 전단력은 산삼 배양액 급여군과 대조군 사이에 차이를 보이지 않았으며, 저작성도 급여군 상호간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 11. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng (TCM-KWG) on purge loss, cooking loss and mechanical testure characters of *longissimus dorsi muscle* in pigs.

산삼배양액 (ml/L)	Purge loss(%)	Cooking loss(%)	Shearing force(kg/cm ²)	Hardness (kg/cm ²)	Cohesiveness (%)
0	2.9±0.25	15.2±0.04	5.42	8.21	20.38
16	2.8±0.02	15.1±0.52	5.61	8.15	20.56

3. 이화학적 특성

가. 계육의 이화학적 특성

산삼 배양액의 급여가 육계 가슴육의 지방산 조성에 미치는 영향은 Table 12에 나타내었다. 계육의 주요 지방산 조성은 oleic acid(28.47-29.44%), linoleic acid(23.47-24.08%), palmitic acid (23.0-23.46%), stearic acid(9.90-10.72%) 순으로 나타났으며, 산삼 배양액 급여로 가슴육의 지방산 함량 변화는 없는 것으로 나타났다.

Table 12. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on fatty acid composition of breast meat in Expt 1

Fatty acids (%)	Treatments(ml/L)						PSE
	0	2	4	8	16	32	
C10:0	0.20	0.21	0.23	0.24	0.25	0.26	0.012
C12:0	0.17	0.15	0.17	0.19	0.20	0.20	0.031
C14:0	0.40	0.37	0.34	0.43	0.49	0.46	0.025
C14:1	0.09	0.07	0.06	0.12	0.13	0.11	0.012
C15:0	0.08	0.07	0.07	0.11	0.15	0.13	0.012
C16:0	23.02	23.46	23.13	23.35	23.22	23.19	0.144
C16:1	3.31	3.60	3.63	3.67	3.28	3.07	0.106
C17:0	0.06	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.012
C18:0	10.44	10.36	9.90	10.00	10.45	10.72	0.178
C18:1	28.97	29.44	30.26	29.40	28.48	28.47	0.519
C18:2	24.08	23.47	23.49	23.53	23.92	23.85	0.288
C18:3n6	0.09	0.03	0.03	0.03	-	-	0.015
C18:3n3	0.91	1.04	1.12	1.00	0.92	0.81	0.050
C20:1	0.13	0.13	0.13	0.13	0.11	0.06	0.027
C20:2	0.89	0.70	0.74	0.73	0.70	0.54	0.058
C20:3n6	1.38	1.35	1.25	1.30	1.33	1.33	0.042
C20:3n3	5.73	5.54	5.43	5.74	6.31	6.78	0.215
SFA ¹	34.37	34.66	33.92	34.35	34.82	34.99	0.615
MUFA	32.51	33.25	34.08	33.32	32.00	31.71	0.936
PUFA	33.08	32.13	32.06	32.33	33.18	33.31	0.483

¹ SFA : Saturated fatty acid, MUFA : Monounsaturated fatty acid. PUFA : Polyunsaturated fatty acid.

Table 13에서는 사양 전기(1-3), 후기(4-5) 및 전체(1-5) 기간 동안 산삼 배양액을 음수로 급여한 후 도계한 육계 가슴육의 지방산 조성과 콜레스테롤 함량을 나타내었다. 산삼 배양액의 급여가 계육의 지방산과 콜레스테롤 함량에는 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

Table 13. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on fatty acid composition and cholesterol of breast meat in Expt. 2

Fatty acids (%)	Treatments(ml/L)				PSE
	0	Starter-p	Finisher-p	Whole-p	
C14:0	0.66	0.68	0.60	0.70	0.015
C16:0	25.88	25.42	25.08	26.26	0.195
C16:1	1.95	2.86	2.57	3.41	0.220
C18:0	10.68	9.27	9.63	8.70	0.293
C18:1	24.89	26.34	26.30	25.22	0.330
C18:2	26.13	27.43	26.93	27.03	0.298
C18:3	0.81	1.06	0.96	1.05	0.046
C20:2	0.54	0.53	0.69	0.56	0.051
C20:3n6	1.02	0.86	0.94	1.01	0.051
C20:3n3	7.93	6.20	6.86	6.04	0.327
SFA ¹	37.24	35.16	35.17	35.67	0.330
MUFA	26.84	29.19	28.86	28.64	0.450
PUFA	36.21	36.66	35.03	35.69	0.391
Cholesterol (mg/g dry wt.)	1.54	1.60	1.65	1.52	0.065

¹ Starter period, Finisher period, Whole period

¹ SFA : Saturated fatty acid, MUFA : Monounsaturated fatty acid. PUFA : Polyunsaturated fatty acid.

산삼배양액의 급여에 따른 가슴육의 아미노산 조성은 Table 14에 나타내었다. 아미노산 조성은 산삼 배양액을 급여한 처리구가 대조구에 비하여 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나 유의성있는 차이는 없는 것으로 나타났다 (Fig.8).

Table 14. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on amino acid composition of breast meat.

amino acids	control 1 (%)	control 2 (%)	control 3 (%)	Mean	Ginseng	Ginseng	Ginseng	Mean
					1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Aspartic Acid	2.14	2.05	2.13	2.106	2.07	1.87	2.11	2.017
Threonine	1.02	1	1.04	1.02	1.01	0.91	1.02	0.98
Serine	0.9	0.87	0.91	0.893	0.87	0.81	0.89	0.857
Glutamic Acid	3.37	3.37	3.48	3.406	3.27	3.02	3.36	3.217
Proline	0.56	0.57	0.8	0.643	0.76	0.57	0.62	0.65
Glycine	0.97	0.96	0.99	0.973	0.97	0.94	0.96	0.957
Alanine	1.35	1.24	1.29	1.293	1.24	1.14	1.29	1.223
Valine	1.12	1.05	1.09	1.086	1.07	0.96	1.09	1.04
Isoleucine	1.09	1.06	1.08	1.076	1.06	0.96	1.08	1.033
Leucine	1.89	1.82	1.87	1.86	1.82	1.66	1.87	1.783
Tyrosine	0.85	0.81	0.82	0.826	0.8	0.74	0.83	0.79
Phenylalanine	0.9	0.86	0.88	0.88	0.87	0.78	0.89	0.846
Histidine	1.3	1.11	1.26	1.223	1.26	1.08	1.26	1.2
Lysine	2.07	2	2.09	2.053	2.04	1.81	2.04	1.963
Arginine	1.53	1.5	1.58	1.536	1.51	1.37	1.54	1.473

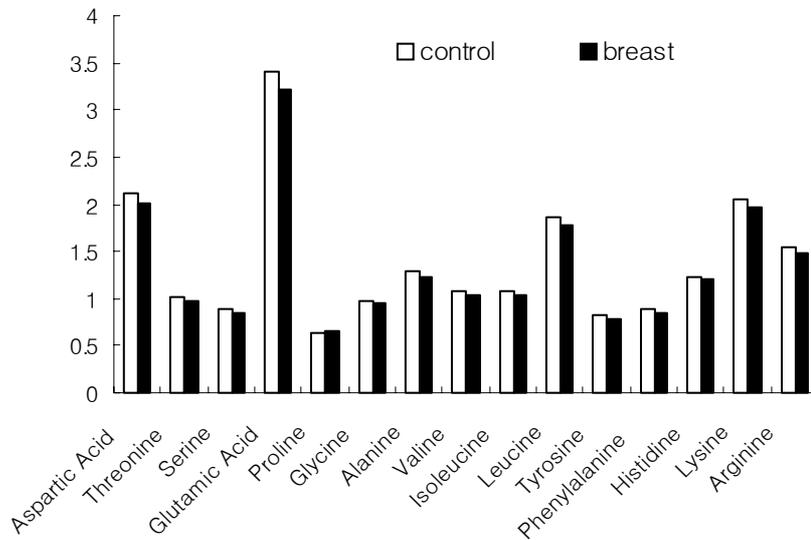


Fig. 8. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on amino acid composition of breast meat

나. 돈육의 이화학적 특성

산삼배양액 급여로 인한 돈육 내 이화학적인 변화를 조사하기 위하여 산삼 배양액 급여 종료 후 자돈을 도살 처리하여 대조군과 급여군간의 지방산 및 아미노산 조성 변화를 조사하였다. 산삼 배양액의 급여가 돈육의 지방산 조성에 미치는 영향은 Table 15에 나타내었다. 돈육의 주요 지방산 조성은 oleic acid (35.64-35.97%), palmitic acid (23.55-23.69%), linoleic acid (18.48-18.68%), stearic acid (13.56-13.65%) 순으로 나타났으며, 산삼 배양액 급여로 필수 지방산인 linolenic acid의 함량이 약간 증가하였다. 또한 EPA (eicosapentaenoic acid)와 DHA (docosahexaenoic acid)의 함량이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 9).

Table 15. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng on fatty acid composition of *longissimus dorsi* muscle in pigs.

Fatty acid(%)	대조군	급여군(16ml/L)
Myristic acid C14:0	1.26	1.36
Myristoleic acid C14:1	0.02	0.03
Pentadecanoic acid C15:0	0.09	0.1
Palmitic acid C16:0	23.69	23.55
Palmitoleic acid C16:1	2.23	2.18
Myristoleic acid C17:0	0.47	0.48
Myristoleic acid C17:1	0.29	0.3
Stearic acid C18:0	13.56	13.65
Oleic acid C18:1	35.64	35.97
Linoleic acid C18:2n6	18.68	18.48
Linolenic acid C18:3n3	0.87	0.91
Arachidic acid C20:0	0.19	0.19
Eicosenoic acid C20:1	0.65	0.68
Eicosadienoic acid C20:2	0.62	0.63
Eicosatrienoic acid C20:3n6	0.22	0.2
Arachidonic acid C20:4n6	1.09	0.8
Cis-8,11,14-Eicosadienoic acid C20:3n3	0.1	0.1
EPA C20:5n3	0.07	0.09
DHA C22:6n3	0.25	0.3

Linolenic acid는 혈압, 혈당치 및 혈중 콜레스테롤 농도를 조절하며 비만증 예방, 노화 예방 및 피부 건강 유지의 효과가 있어서 산삼배양액 급여로 인한 이 지방산의 변화가 의미 있게 보여지며, 또한, EPA는 혈액의 흐름을 방해하는 나쁜 콜레스테롤이나 지방을 제거하는 기능을 하고 동맥경화, 심근 경색 및 뇌혈전등의 성인병을 예방하며, DHA는 뇌의 기능을 활발하게 하며 암의 증식을 억제해 암을 예방하고, 동맥경화에 근거하는 순환기계 질환을 예방하는 효과를 나타내어 산삼배양액 급여로 인한 돈육에서 이런 성분의 변화는 의미 있게 보여진다.

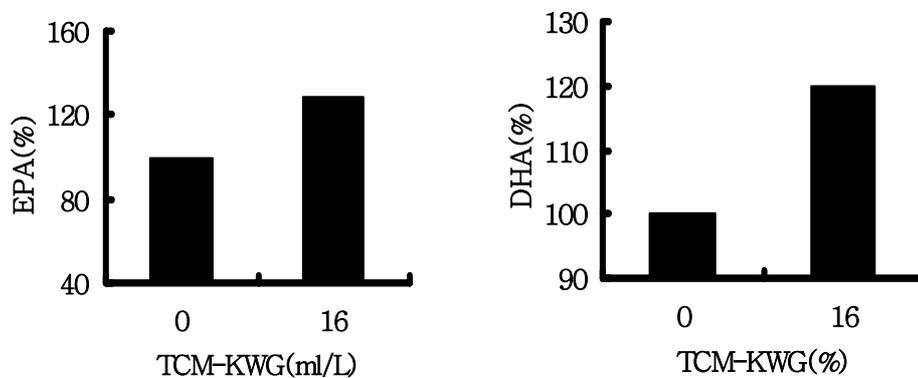


Fig. 9. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on EPA(eicosapentaenoic acid) and DHA(docosahexaenoic acid) of *longissimus dorsi* muscle in pigs.

산삼배양액의 급여에 따른 돈육의 아미노산 조성은 Table 16에 나타내었다. 아미노산 조성은 산삼 배양액을 급여한 처리군이 대조군에 비하여 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나 유의성 있는 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 16. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng on amino acid composition of *longissimus dorsi* muscle in pigs.

Amino acid(%)	대조군	투여군(16ml/L)
Aspartic acid	1.73	1.45
Threonine	0.83	0.72
Serine	0.75	0.63
Glutamic acid	3.15	2.75
Proline	0.7	0.48
Glycine	1.15	0.7
Alanine	1.14	0.89
Valine	0.89	0.76
Isoleucine	0.85	0.73
Leucine	1.53	1.32
Tyrosine	0.67	0.58
Phenylalanine	0.79	0.67
Histidine	0.82	0.59
Lysine	1.62	1.36
Arginine	1.26	1

4. 계란의 품질 분석

산삼 배양액을 급여하여 생산된 계란의 품질은 Table 17에 나타내었다. 난각 강도는 산삼 배양액을 급여한 처리구가 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였으며(Fig. 10) 난각 두께에 있어서는 유의적인 차이를 보였다(Fig. 11). 산삼 배양액 급여한 모든 처리구에서 대조구와 비교하여 현저하게 증가하였다.

Table 17. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on egg qualities of layer at 8 weeks

Treatments (ml/L)	Eggshell breaking strength(kg/cm ²)	Eggshell thickness(μ m)	Albumen height(mm)	Haugh unit	Yolk color score
0	3.91	345.2 ^b	10.07	99.57	7.43
4	4.15	364.7 ^a	9.68	97.53	7.80
8	4.43	371.4 ^a	9.98	99.10	7.62
16	4.27	374.4 ^a	9.64	97.32	7.97
32	4.26	366.5 ^a	10.15	99.90	7.87
PSE	0.065	2.165	0.107	0.503	0.086

^{a,b} Means with the different superscripts within a column differ significantly(P<0.05)

난백고, 호유닛 및 난황의 색도에 있어서는 산삼 배양액의 급여 효과가 없는 것으로 나타났다. 산삼 배양액 급여에 의해 난각의 강도와 두께가 현저히 증가하였는데, 난각의 성분은 무기물이 95%를 차지하고 유기물이 3.3%, 수분이 1.6%정도이며 신생란의 미생물 침입으로부터 2차적 방어기구이다. 난각의 성

분 변화에 따른 난각 강도와 두께의 증가는 계란의 이동시 발생할 수 있는 난각 균열을 감소시키고, 세균의 침입을 불리하게 하여 계란의 보존성 및 상품성을 높여 줄 수 있을 것으로 판단된다.

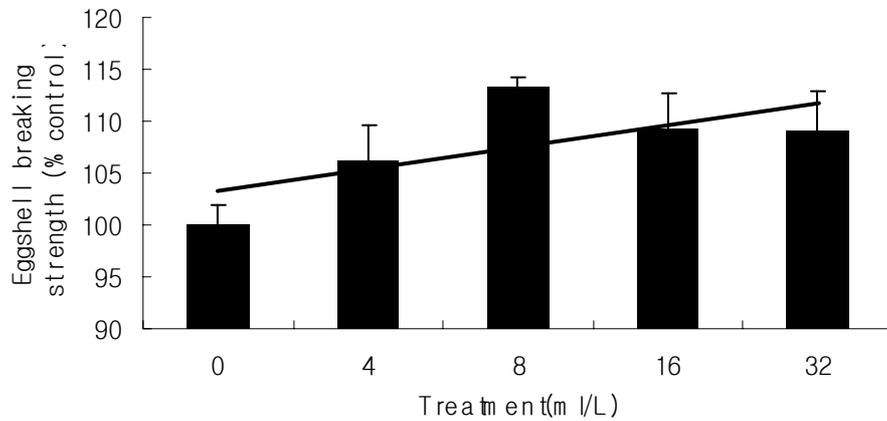


Fig. 10. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on Eggshell breaking strength at 8 weeks

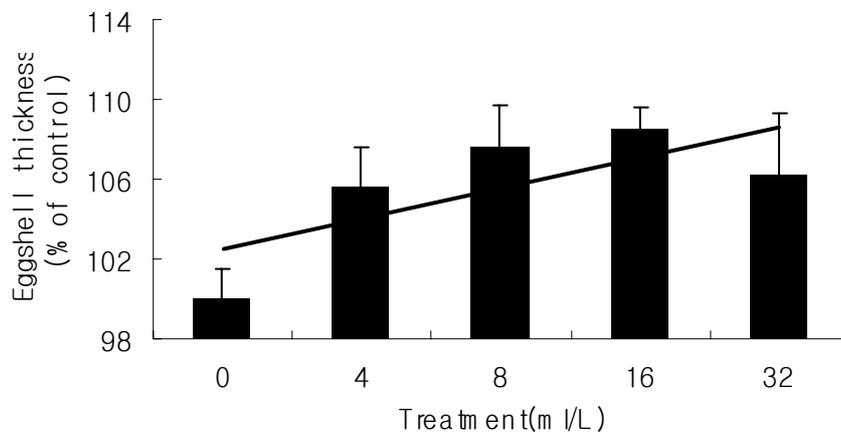


Fig. 11. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on Eggshell thickness at 8 weeks

산삼 배양액을 급여하여 시험 개시 16주 후에 측정된 계란의 품질은 Table 18에 나타내었다. 난각 강도, 난각 두께, 난백고, 호유닛 그리고 난황의 색도에 있어서 산삼 배양액 급여구와 대조구 사이에 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 18. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on egg qualities of layer at 16 weeks

Treatments (ml/L)	Eggshell breaking strength(kg/cm ²)	Eggshell thickness(μ m)	Albumen height(mm)	Haugh unit	Yolk color score
0	4.33	367.3	7.76	86.83	7.37
4	4.39	368.0	7.68	86.77	7.10
8	4.43	350.7	7.82	88.07	7.66
16	4.35	362.7	7.66	85.97	7.43
32	4.35	362.3	7.70	86.60	7.80
PSE	0.06	3.05	0.10	0.59	0.09

산삼 배양액을 급여하여 시험 개시 24주 후에 측정된 계란의 품질은 Table 19에 나타내었다. 난각 두께는 산삼 배양액을 처리한 급여구가 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였으나(Fig. 12), 난각 강도, 난백고, 호유닛 그리고 난황의 색도에 있어서 산삼 배양액 급여구와 대조구 사이에 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 19. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on egg qualities of layer at 24 weeks

Treatments (ml/L)	Eggshell breaking strength(kg/cm ²)	Eggshell thickness(μ m)	Albumen height(mm)	Haugh unit	Yolk color score
0	3.97	354	6.33	76.03	8.21
4	3.86	356	6.55	77.67	8.00
8	4.14	365	6.36	76.92	8.05
16	4.16	360	6.41	76.79	8.47
32	4.15	365	6.31	75.88	8.30
PSE	0.07	2.49	0.10	0.43	0.07

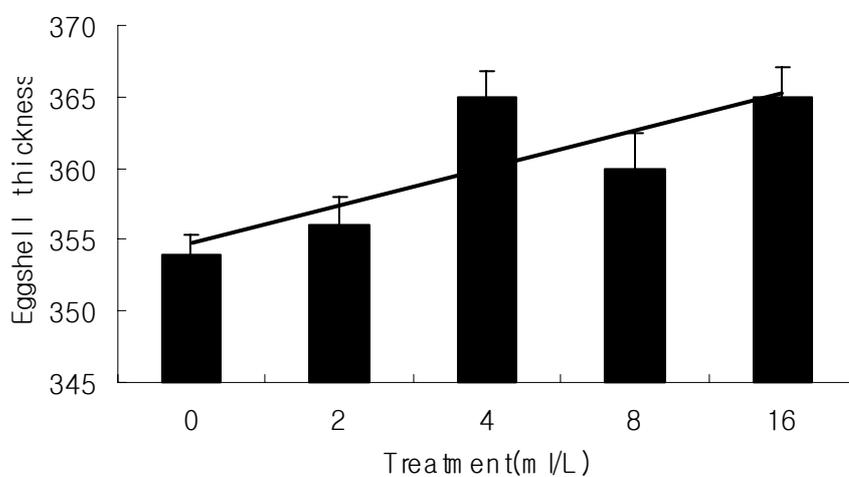


Fig. 12. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on Eggshell thickness at 24 weeks

산삼 배양액의 급여가 난황의 지방산 조성에 미치는 영향은 Table 20에 나타내었다. 난황의 주요 지방산 조성은 oleic acid(39.63-41.15%), palmitic acid(25.96-27.35%), linoleic acid(12.44-14.78%), stearic acid(9.95-10.27%) 순으로 나타났으며, 산삼 배양액 급여로 난황의 지방산 함량의 차이는 없는 것으로 나타났다. 다가 불포화 지방산의 비율에 있어서도 대조구와 차이는 없었으나 산삼 배양액 급여구가 증가하는 경향을 보였다

Table 20. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on fatty acid composition in yolk at 8 weeks

Fatty acids (%)	Treatments(ml/L)					PSE
	0	4	8	16	32	
C14:0	0.29	0.30	0.31	0.30	0.29	0.007
C14:1	0.08	0.05	0.09	0.07	0.06	0.004
C15:0	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.003
C16:0	27.20	27.35	27.33	26.47	25.96	0.247
C16:1	4.06	3.12	3.54	3.61	2.84	0.232
C17:0	0.11	0.13	0.12	0.16	0.17	0.008
C17:1	0.12	0.11	0.10	0.12	0.11	0.004
C18:0	10.27	10.17	10.23	9.95	10.07	0.178
C18:1	41.15	39.63	40.42	39.83	40.72	0.608
C18:2	12.44	13.26	12.72	14.06	14.78	0.602
C18:3n6	0.10	0.14	0.13	0.15	0.16	0.009
C18:3n3	0.25	0.22	0.25	0.28	0.27	0.011
C20:0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.003
C20:1	0.25	0.49	0.23	0.24	0.21	0.062
C20:2	0.15	0.21	0.16	0.20	0.25	0.020
C20:3n6	0.15	0.18	0.16	0.17	0.18	0.011
C20:3n3	2.43	3.52	3.14	3.23	3.05	0.149
C22:0	0.03	0.09	0.05	0.04	0.05	0.013
C22:6	0.86	0.96	0.94	1.02	0.77	0.037
SFA ¹	37.97	38.11	38.11	37.00	36.60	0.301
MUFA	45.65	43.40	44.38	43.87	43.94	0.681
PUFA	16.38	18.49	17.50	19.11	19.46	0.688

¹ SFA : Saturated fatty acid, MUFA : Monounsaturated fatty acid. PUFA : Polyunsaturated fatty acid.

산삼 배양액의 급여가 난황의 지방산 조성(16주)에 미치는 영향은 Table 21에 나타내었다. 난황의 주요 지방산 조성은 oleic acid, palmitic acid, linoleic acid, stearic acid 순으로 나타났으며, 대조구와 비교하여 볼 때, 산삼 배양액의 급여가 난황 지방산 함량에 영향을 미치지 못한 것으로 나타났다. 다가 불포화 지방산의 비율에 있어서도 차이는 없었으나 산삼 배양액 급여구가 증가하는 경향을 보였다.

Table 21. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on fatty acid composition in yolk at 16 weeks

Fatty acids (%)	Treatments(ml/L)					Pooled SE
	0	4	8	16	32	
C14:0	0.27	0.25	0.27	0.23	0.24	0.007
C14:1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.003
C15:0	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05	0.003
C16:0	28.10	28.74	28.51	27.95	27.62	0.318
C16:1	3.67	3.35	3.67	3.77	2.70	0.137
C17:0	0.08	0.08	0.08	0.09	0.10	0.010
C17:1	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.009
C18:0	10.15	0.73	10.78	10.01	11.19	0.211
C18:1	38.87	36.39	38.25	38.10	36.26	0.627
C18:2	13.69	15.24	13.18	14.54	16.38	0.402
C18:3n6	0.02	0.06	0.03	0.07	0.03	0.012
C18:3n3	0.09	0.14	0.10	0.15	0.14	0.019
C20:1	0.03	0.03	0.04	0.01	0.02	0.012
C20:2	0.01	0.04	0.05	0.01	0.02	0.012
C20:3n6	0.04	0.04	0.09	0.10	0.04	0.019
C20:3n3	3.73	3.86	3.78	3.88	3.97	0.089
C22:6	1.12	0.92	1.02	0.99	1.16	0.057
SFA ¹	38.64	39.85	39.69	38.33	39.20	0.469
MUFA	42.67	39.85	42.05	41.96	39.06	0.708
PUFA	18.69	20.29	18.27	19.72	21.74	0.445

¹ SFA : Saturated fatty acid, MUFA : Monounsaturated fatty acid. PUFA : Polyunsaturated fatty acid.

산삼 배양액의 급여가 난황의 지방산 조성(24주)에 미치는 영향은 Table 22에 나타내었다. 난황의 주요 지방산 조성은 oleic acid, palmitic acid, linoleic acid, stearic acid 순으로 나타났다. 그리고 난황의 콜레스테롤 함량은 12.29-13.52mg/g 수준으로 처리구 상호간에 차이가 없었다. 산란기에 산삼 배양액의 급여 결과, 난황의 지방산 조성(24주)과 콜레스테롤 함량에는 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 22. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on fatty acid composition and cholesterol in yolk at 24 weeks in Expt. 3

Fatty acids (%)	Treatments(ml/L)					PSE
	0	4	8	16	32	
C14:0	0.31	0.38	0.34	0.37	0.36	0.011
C14:1	0.06	0.10	0.09	0.09	0.08	0.005
C16:0	27.08	28.54	28.86	27.93	27.82	0.249
C16:1	3.43	4.15	3.51	4.16	3.86	0.163
C18:0	8.02	7.69	7.49	7.61	7.51	0.151
C18:1	43.66	40.14	41.03	43.70	42.65	0.627
C18:2	14.70	16.26	15.85	13.55	15.17	0.536
C18:3n3	0.24	0.31	0.26	0.22	0.26	0.012
C20:3n3	2.10	2.03	2.11	1.96	1.90	0.077
C22:6	0.41	0.41	0.49	0.41	0.38	0.017
SFA ¹	35.41	36.61	36.69	35.91	35.69	0.251
MUFA	47.29	44.39	45.91	47.94	46.60	0.698
PUFA	17.46	18.90	18.72	16.15	17.71	0.210
Cholesterol (mg/g)	12.29	12.37	12.73	13.52	12.33	0.232

¹ SFA : Saturated fatty acid, MUFA : Monounsaturated fatty acid. PUFA : Polyunsaturated fatty acid.

제 2 세부과제 : 산업동물의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명

1. 생산성에 미치는 효과

가. 육계의 생산성 및 백신 항체가 측정

육계에 5주간 산삼 배양액을 음수로 급여하여 조사한 생산성은 Table 23에 나타내었다. 증체량에 있어서 사양 전기(1-3), 후기(4-5) 및 전체(1-5) 기간 동안 산삼 배양액 급여구는 대조구와 비교하여 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 23. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on the performance of broiler chicks in Expt. 1

Treatments (ml/L)	Weight gain(g)			Feed intake(g)			Feed conversion			NDV titer (log ₂)
	1-3 wk	4-5 wk	1-5 wk	1-3 wk	4-5 wk	1-5 wk	1-3 wk	4-5 wk	1-5 wk	
0	575.1	950.0	1,525	883.5	1,797	2,681	1.536	1.893	1.758	8.5
2	543.1	925.5	1,469	859.7	1,745	2,604	1.583	1.886	1.772	8.9
4	560.6	920.2	1,481	873.0	1,733	2,606	1.558	1.883	1.759	8.4
8	588.0	958.0	1,546	907.8	1,797	2,704	1.544	1.876	1.749	8.5
16	531.4	931.4	1,463	832.7	1,737	2,569	1.567	1.866	1.756	8.7
32	530.6	921.9	1,453	830.0	1,717	2,547	1.564	1.862	1.753	8.3
PSE	6.73	9.17	13.31	9.38	20.47	23.04	0.01	0.01	0.01	0.25

사료 섭취량도 산삼 배양액과 대조구 사이에 차이가 없었으며, 사료 요구율 또한 처리구 상호간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 ND 백신 항체가 있어서도 산삼 배양액 급여구와 대조구간에 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 24에서는 사양 전기(1-3), 후기(4-5) 및 전체(1-5) 기간 동안 산삼 배양액을 음수로 급여한 후 조사한 생산성을 나타내었다. 증체량에 있어서는 산삼 배양액을 전기에만 급여한 처리구가 사육 전기, 후기 및 전 기간 동안 증가하는 경향을 보였다. 사료 섭취량은 산삼배양액을 급여한 처리구가 일반적으로 높게 나타났으며, 사료 요구율은 산삼 배양액을 전기에만 급여한 처리구가 대조구에 비하여 개선되는 경향을 보였다. 하지만 산삼 배양액의 급여가 육계의 생산성에 미치는 효과는 시험 1과 동일하게 통계적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 24. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on the performance of broiler chicks in Expt. 2

Treatments (8ml/L)	Weight gain(g)			Feed intake(g)			Feed conversion		
	1-3 wk	4-5 wk	1-5 wk	1-3 wk	4-5 wk	1-5 wk	1-3 wk	4-5 wk	1-5 wk
0	651	938	1,589	947	1,862	2,809	1.454	1.985	1.768
Starter-p ¹	674	965	1,639	953	1,910	2,863	1.414	1.979	1.747
Finisher-p	653	940	1,593	941	1,878	2,829	1.441	1.998	1.776
Whole-p	670	945	1,615	958	1,868	2,826	1.430	1.977	1.750
PSE	6.58	7.47	13.55	8.56	19.38	21.56	0.01	0.01	0.01

¹ Starter period, Finisher period, Whole period

나. 이유자돈의 생산성

산삼배양액의 급여가 이유 후 자돈의 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 시험군당 산삼배양액을 0, 4, 8 그리고 16ml/L의 비율로 음수에 희석하여 자유 급식 하였다. 각 급여군의 체중 변화를 조사하기 위하여 급여 개시전과 종료 후의 체중을 측정하였으며, 사료섭취량 또한 체중 측정시 사료량을 조사하여 측정하였다. Table 25에서는 이유 후 4주 동안 산삼 배양액을 음수로 급여한 후 조사한 자돈의 증체량과 사료섭취량을 나타내었으며, 또한 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 산출하여 나타내었다. 사료섭취량은 산삼배양액을 급여한 그룹과 대조군의 차이가 보이지 않았으며, 사료요구율 또한 처리구 상호간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 증체량은 산삼 배양액을 급여한 처리군에서 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였고, 또한 일일 증체량도 급여군이 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보여 산삼배양액의 급여가 이유자돈의 생산성 증가에 영향을 줄 것으로 사료된다.(Fig. 13)

Table 25. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng in pigs (n=15)

Treatment (ml/L)	Weight gain(kg)	Feed intake(kg/두)	Feed conversion
0	10.8±4.36	1.39±0.26	19.99±0.06
4	12.1±3.97	1.35±0.45	19.67±0.09
8	11.7±5.07	1.41±0.45	17.84±0.10
16	11.4±3.64	1.39±0.51	20.42±0.17

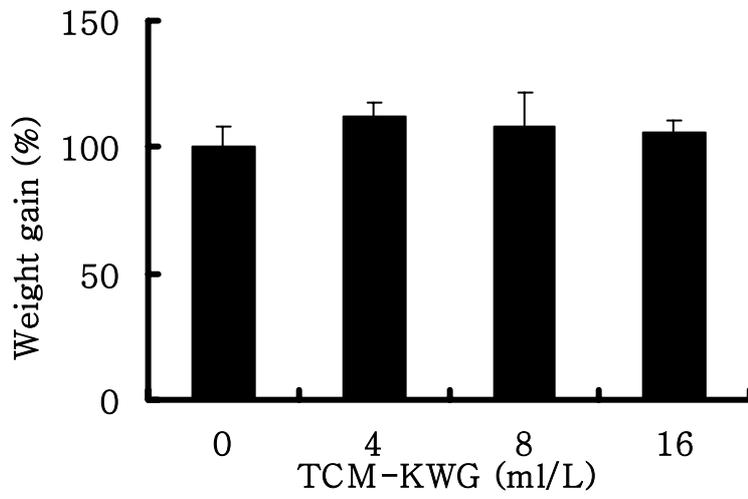


Fig. 13. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) of weight gain in pigs.

2. 폐사율 및 질병발생률

가. Challenge Test

산삼 배양액 투여에 의해 질병에 대한 저항성을 획득하는지 평가하기 위하여 *Salmonella gallinarum*을 이용하여 5주령의 육계에서 3주 동안 challenge test를 실시하였다(Fig. 14) Table 26은 challenge test 결과로서 육계에 *Salmonella gallinarum*을 경구 투여한 후 총폐사수와 폐사율(%)을 나타내었다. 산삼 배양액 2ml/L 급여구에서의 폐사수는 보이지 않았지만 4, 8, 16, 32 ml/L 급여구에서 대조구에 비해 폐사율이 두드러지게 감소하여 유의성 있는 결과를 보였다(Fig.15). 본 연구결과는 산삼배양액을 투여한 육계에서 *Salmonella*에 대한 높은 저항성을 나타내었음을 보여주었으며, 폐사수와 폐사율이 감소함으로써 산삼배양액이 양계농장에 대한 생산성 향상에 기여할 수 있음을 보여주었다.



Fig. 14. Photograph picture of experimental site for challenge test and pathologic tissue

Table 26. Salmonella gallinarum challenge test report

days	Death Number																				Total Death	Mortality (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
0							1							2						1	4	26.7
4						1					1						1				3	20.0
8							1	1													2	13.3
16												1									1	6.7
32										1											1	6.7
Total Death						1	2	1	1		2			2		1				1	11	

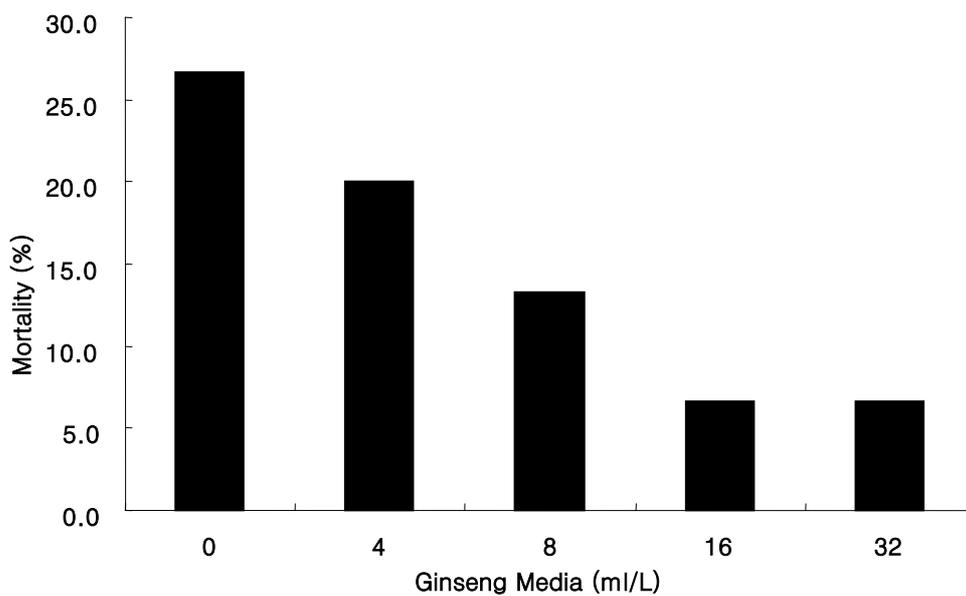


Fig. 15. Mortality rate by salmonella gallinarum challenge in each group.

나. 이유자돈의 폐사율 및 질병 발생율

산삼배양액 급여로 인한 이유자돈의 폐사율 및 질병 발생율을 조사하기 위하여 각 급여군을 매일 일정하게 건강 상태 및 질병 유무를 확인하였다. Table 27과 28은 산삼배양액 급여 기간 동안 자돈의 폐사수와 질병 발생율을 나타내었다. 산삼배양액을 급여한 4주 동안 폐사된 자돈은 볼 수 없었으며, 0~1주 동안 8ml/L의 산삼배양액을 급여한 군에서 한두, 1~2주 동안 산삼배양액을 급여하지 않은 군에서 한두가 경미하게 발열과 설사증상을 보였으나 바로 호전되었다. 그리고 2~4주 동안은 각 급여군 당 질병에 걸린 자돈은 보이지 않았다. 이러한 결과로 산삼배양액의 급여에 따른 자돈의 폐사율과 질병 발생율에는 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

Table 27. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng on mortality rate at 4 weeks (n=15)

Mortality					
Days	0-1 week	1-2 week	2-3 week	3-4 week	총 폐사수
0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0

Table 28. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng on the incidence of disease at 4 weeks (n=15)

Days	0-1 week	1-2 week	2-3 week	3-4 week	Number	Rate (%)
0	0	1	1	0	2	13
4	0	0	1	0	1	6.7
8	1	1	0	0	2	13
16	0	0	0	1	1	6.7

3. 산란계의 생산성

Table 29는 산란계를 이용하여 산삼 배양액의 급여 효과를 나타내었다. 시험 개시 후부터 8주 동안 조사한 산란율에 있어서 산삼 배양액 4, 8, 16ml/L 급여구는 대조구와 비교하여 차이가 없었지만, 32ml/L 급여구에서는 유의하게 감소하였다. 난중은 대조구와 차이가 없었고, 산란량은 32ml/L 급여구가 유의하게 감소하였다. 사료 섭취량은 처리구간 차이가 없었으나 산삼배양액 32ml/L 급여구가 유의적으로 증가하였다.

Table 29. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on performance of layer at 8 weeks

Treatments (ml/L)	Egg production(%)	Egg weight (g)	Egg mass (g)	Feed intake (g/hen/d)	FCR
0	63.2 ^{ab}	52.1	32.8 ^{ab}	97.6	3.052 ^{bc}
4	67.5 ^a	52.1	35.2 ^a	97.0	2.783 ^c
8	63.0 ^{ab}	52.3	32.9 ^{ab}	97.0	2.978 ^{bc}
16	56.7 ^{bc}	52.8	30.0 ^b	96.4	3.275 ^b
32	49.8 ^c	52.5	26.0 ^c	95.6	3.843 ^a
PSE	1.50	0.12	0.77	0.68	0.08

^{a,b,c} Means with the different superscripts within a column differ significantly(P<0.05)

Table 30는 9-16주 동안 산란계의 생산성을 나타내었다. 산란율과 난중은 산삼 배양액 급여구와 대조구 사이에 차이가 없었다. 그러나 산란양에 있어서는 산삼 배양액 급여구가 대조구와는 차이가 없었으나 32ml/L 급여구는 16ml/L 급여구에 비하여 유의적으로 감소하였다. 그리고 사료 섭취량과 사료 요구율은 처리구간 차이를 보이지 않았다.

Table 30. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on performance of layer at 16 weeks

Treatments (ml/L)	Egg production(%)	Egg weight (g)	Egg mass (g)	Feed intake (g/hen/d)	FCR
0	90.5	62.1	56.2 ^{ab}	127.6	2.270
4	91.3	60.9	55.6 ^b	122.3	2.200
8	90.6	61.6	55.1 ^b	120.6	2.189
16	92.6	63.2	58.5 ^a	127.2	2.174
32	88.0	62.3	54.8 ^b	125.2	2.285
PSE	0.63	0.30	0.45	1.52	0.03

^{a,b} Means with the different superscripts within a column differ significantly(P<0.05)

Table 31는 산삼 배양액을 급여한 산란계를 이용하여 16-24주 동안의 산란계의 생산성 효과를 나타내었다. 산란율과 난중, 산란양에 있어서는 산삼 배양액 급여구와 대조구의 차이가 없었고, 사료 요구량은 처리구간 차이가 없었으나 산삼배양액 32ml/L 급여구가 유의적으로 감소하였다..

Table 31. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on performance of layer at 24 weeks

Treatments (ml/L)	Egg production(%)	Egg weight (g)	Egg mass (g)	Feed intake (g/hen/d)	FCR
0	87.6	63.5	55.6	133.2	2.396
4	88.4	64.9	57.4	135.4	2.359
8	88.6	63.1	55.9	134.6	2.408
16	89.6	64.5	57.8	136.4	2.360
32	87.0	63.8	55.5	130.5	2.351
PSE	0.56	0.30	0.45	1.52	0.03

4. 혈액의 정상 분석

가. 육계의 혈액 정상 분석

Table 32, 33, 34는 닭에서 혈액을 채혈한 후에 원심 분리하여 혈청을 분리하고 이들 혈청에서 혈장단백질 (albumine, globuline 등), 효소 (aspartate aminotransferase 및 gamma-glutamyl transferase), 광물질(Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , K^+ 및 Mg^{2+})등을 검사하여 대조군과 실험군간을 비교하였다. 산삼배양액을 처리한 실험군에서의 Total protein이나 Total cholesterol (mg/dL), albumine, 중성지방은 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 또한 alpha2-Globulin(%)과 gamma-Globulin (%)의 변화가 대조군과 비교하여 실험군에서 증가하거나 감소하는 경향을 보이지만 유의성 있는 차이는 나타내지 않았다. 그러나 산삼 배양액을 투여한 실험군에서의 Ca^{2+} , Pi, K^+ 의 변화는 대조군에 비해 두드러지게 증가하는 경향을 보여 처리군 상호간에 유의성 있는 차이가 나타났다 (Fig. 16, 17, 18). 칼슘(Ca^{2+})은 골격의 형성, 유지 및 난각의 형성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 본 연구 결과 산삼 배양액 투여군의 혈청에서 칼슘의 양이 증가하였으며 이는 산삼배양액이 실험 동물의 골격 및 난각 형성에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 인(Pi)은 지질 및 탄수화물 대사에 관여하고 골격형성 및 혈액의 pH 조절에도 관여한다. 본 연구 결과 산삼배양액 투여군의 혈청에서 인(Pi) 양의 증가는 골격 형성 및 발육에 영향을 줄 것으로 생각된다. 칼륨(K^+)은 체액의 산, 염기의 평형 유지 및 삼투압 조절에 중요한 역할을 한다. 산삼 배양액 투여로 인한 혈청 중 칼륨의 양 증가는 체액의 항상성 유지 및 발육 촉진에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Table 32. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on blood

Treatem net(ml/L)	T.protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	T. cholesterol (mg/dL)	Triglycer ide (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Uric acid (mg/dL)
0	2.6	1.1	171.0	5180.0	110.3	46.7	0.2	6.0
2	2.6	1.1	203.0	5306.7	116.7	52.7	0.2	7.3
4	2.7	1.1	175.3	10006	119.3	70.3	0.2	6.8
8	2.3	1.0	197.7	3073.3	104.0	51.3	0.1	5.1
16	2.4	1.1	192.7	5673.3	133.0	75.0	0.3	6.1
32	2.5	1.0	169.3	4046.7	105.0	63.7	0.2	8.3

Table 33. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on albumine, globulin.

Albumin (%)	alpha1-Globulin (%)	alpha2-Globulin (%)	beta-Globulin (%)	Gamma-Globulin (%)
54.1	2.1	19.6	2.7	21.5
57.4	2.7	17.8	2.7	19.4
60.7	1.8	14.8	2.2	20.5
62.3	2.7	13.8	1.7	19.6
58.2	3.6	12.0	3.9	22.4
55.8	2.6	16.3	1.3	24.0

Table 34. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on minerals

Name	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Pi (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	149.0	6.1	105.7	7.9	11.6
2	148.7	6.4	105.7	7.8	11.3
4	151.3	6.3	107.3	7.8	11.5
8	151.0	6.4	107.0	8.2	11.5
16	150.3	6.7	106.3	8.7	11.9
32	153.3	7.5	107.3	10.0	12.0
water	4.0	0.2	1.5	0.2	0.7
ginseng	6.0	16.3	0.5	2.9	2.7

(Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻, K⁺)

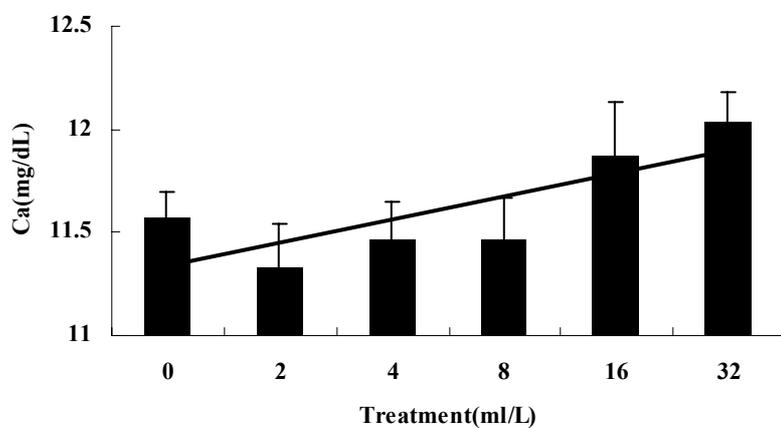


Fig. 16. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on calcium(Ca²⁺)

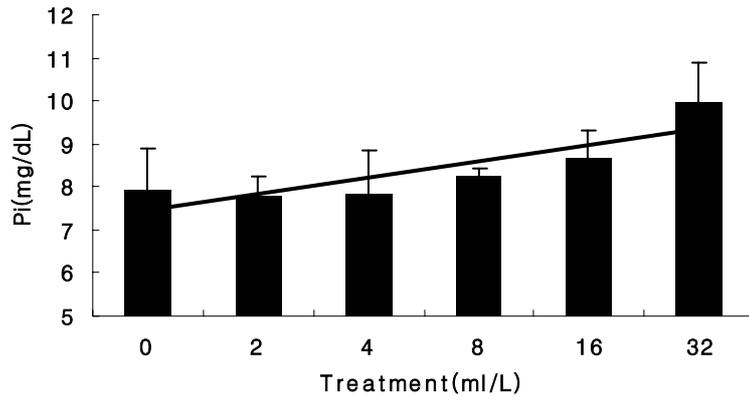


Fig. 17. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on phosphate(Pi)

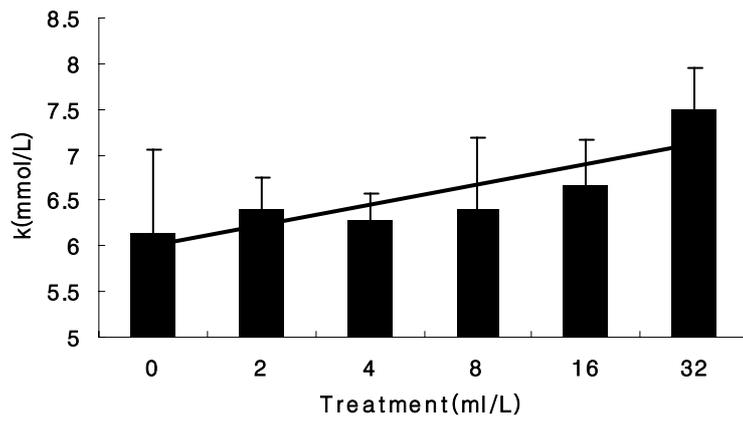


Fig. 18. Effect of feeding artificial culture medium of wild ginseng on potassium(K⁺)

나. 자돈의 혈액의 정상 분석

산삼배양액 급여에 의한 혈액의 정상 변화 정도를 분석하기 위하여 실험 종료 후 각 급여군당 5마리씩 전대정맥(anterior vena cava)에서 혈액을 채취하였다. Table 35, 36은 자돈에서 혈액을 채혈한 후에 혈액의 일반 성분과 정상(WBC, RBC 및 hematocrit 등), 그리고 적혈구 지수(MCV, MHC 및 MCHC) 및 백혈구 종류 등을 검사하여 대조군과 산삼배양액 급여군과의 변화를 비교하였다. 산삼배양액을 급여한 실험군에서의 백혈구, 적혈구 및 혈구용적비의 유의성 있는 차이는 보이지 않았으며, 또한 평균적혈구용적, 평균적혈구혈색소량 및 평균적혈구혈색소농도등의 적혈구 지수와 호중구, 림프구, 단핵구 등의 백혈구에서도 대조군에 비교하여 산삼배양액 급여한 실험군에서 증가하거나 감소하는 경향을 보이지만 유의성 있는 차이는 나타내지 않았다.

Table 35. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on a general composition of blood in pigs. (n=3)

산삼 배양액 (ml/L)	WBC (K/uL)	RBC (M/uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (k/uL)
0	20.58±5.27	7.14±0.14	14.20±1.11	43.67±3.45	61.13±4.11	19.90±1.21	32.53±1.89	209.67±169.00
4	23.21±5.80	7.00±0.26	12.37±0.96	38.77±3.50	55.33±3.54	17.67±1.47	32.03±2.56	302.67±142.61
8	33.11±15.7	7.47±0.48	12.53±0.21	42.50±2.17	56.97±1.27	16.80±0.82	29.53±1.10	279.00±126.69
16	22.93±8.46	6.99±0.69	14.17±1.96	44.57±8.81	63.27±6.53	20.20±0.95	32.07±2.45	255.00±209.62

Table 36. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on a leukocyte of blood in pigs. (n=3)

산삼배양액 (ml/L)	Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)
0	34.10±3.44	44.97±5.06	8.77±2.29	9.50±4.28	2.67±1.24
4	32.30±6.52	49.87±13.37	5.63±1.01	10.13±6.11	2.07±1.33
8	36.07±12.37	45.97±13.98	5.60±0.70	10.30±4.03	2.07±0.50
16	24.10±2.00	61.53±3.36	7.77±1.32	5.20±2.18	1.40±0.17
참고치	28.0-51.0	39.0-62.0	2.0-10.0	0.2-11.0	0.0-2.0

Table 37, 38, 39은 자돈에서 혈액을 채혈한 후에 원심 분리하여 혈청을 분리하고 이들 혈청에서 혈장단백질 (albumine, globuline 등), 효소 (aspartate aminotransferase 및 alanine aminotransferase), 광물질(Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , K^+ 및 Mg^{2+}) 등을 검사하여 대조군과 실험군간을 비교하였다. 산삼배양액을 처리한 실험군에서 Total protein과 albumin, 중성지질은 대조군에 비하여 실험군에서 증가하는 경향을 보이나 유의성 있는 차이는 보이지 않았으며, 또한 cholesterol, AST 및 ALT 등의 차이도 대조군에 비해 변화를 보이지 않았다.

그러나 산삼배양액을 투여한 실험군에서 미량 원소중 Ca^{2+} 의 농도 변화가 대조군에 비해 두드러지게 증가되었으며 alpha2-globulin, beta-globulin 및 gamma-globulin등의 글로불린 농도가 대조군과 비교하여 산삼배양액을 급여한 실험군에서 유의성 있게 변화를 보였다(Fig. 19, 20). 칼슘(Ca^{2+})은 골격의 형성과 유지를 위해 매우 중요한 역할을 하며 또한 혈액 응고에 필수적인 요소이다.

Table 37. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on blood composition of pigs.

(n=3)

산삼배양액 (ml/L)	Total Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Uric acid (mg/dL)	Total Bilirubin (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	Cholesterol (mg/dL)
0	6.2±0.10	2.4±0.45	14.3±2.31	1.1±0.06	0.07±0.06	0.5±0.06	88.0±38.59	47.6±14.57	228.0±53.36	88.3
4	6.3±0.50	2.3±0.15	15.0±4.58	1.2±0.15	0.03±0.06	0.5±0.32	126.3±95.6	55.0±1.00	254.0±23.52	102.3
8	6.8±0.98	2.4±0.36	16.0±3.61	1.1±0.12	0.03±0.06	0.4±0.15	89.0±44.51	51.3±9.61	189.0±144.36	98.0
16	7.2±0.56	3.5±0.46	13.0±3.61	1.2±0.06	0.07±0.06	0.7±0.67	72.0±16.46	53.0±1.73	298.3±80.46	89.0

Table 38. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on lipid and minerals content of pigs.

(n=3)

산삼배양액 (ml/L)	Triglyceride (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Pi (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Mg (mg/dL)
0	43.0±9.85	34.3±13.32	47.7±13.50	10.3±0.95	9.5±1.36	142.0±6.24	7.2±0.96	102.3±2.31	2.1±0.15
4	60.3±17.10	42.7±3.06	55.7±6.66	10.3±0.15	9.0±0.51	141.0±1.00	6.6±1.21	99.7±1.53	2.0±0.13
8	53.7±29.69	33.7±14.29	53.3±12.86	10.7±0.85	8.9±2.03	142.3±2.08	7.6±0.86	100.3±0.58	2.0±0.17
16	49.7±11.85	38.0±2.65	46.7±8.14	11.5±0.92	9.7±1.53	142.7±5.51	7.0±1.01	97.3±1.15	2.3±0.33

또한 혈장중의 모든 감마글로블린과 알파 및 베타글로블린의 일부는 항원에

대한 항체를 형성하여 체액성 면역의 주체가 되는데 이러한 글로불린을 면역글로불린이라 한다. 본 연구 결과 산삼배양액 투여군의 혈청에서 칼슘의 증가는 이유자돈에서 골격형성 및 발육촉진에 매우 중요한 영향을 미칠 것으로 생각되며, 면역글로불린의 증가는 이유자돈의 면역력 강화에 따른 질병 저항성의 증가에 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다.

Table 39. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on protein component of serum in pigs. (n=3)

산삼배양액 (ml/L)	Albumin g/dL	Alpha 1 g/dL	Alpha 2 g/dL	Beta g/dL	Gamma g/dL	T. SPE g/dL
0	2.70±0.30	0.00	1.27±0.06	1.13±0.12	1.10±0.26	6.20±0.10
4	2.50±0.20	0.00	1.27±0.12	1.13±0.15	1.43±0.29	6.33±0.50
8	2.50±0.36	0.00	1.43±0.35	1.20±0.17	1.73±0.30	6.87±0.98
16	3.43±0.31	0.00	1.47±0.64	1.27±0.23	1.00±0.10	7.20±0.56

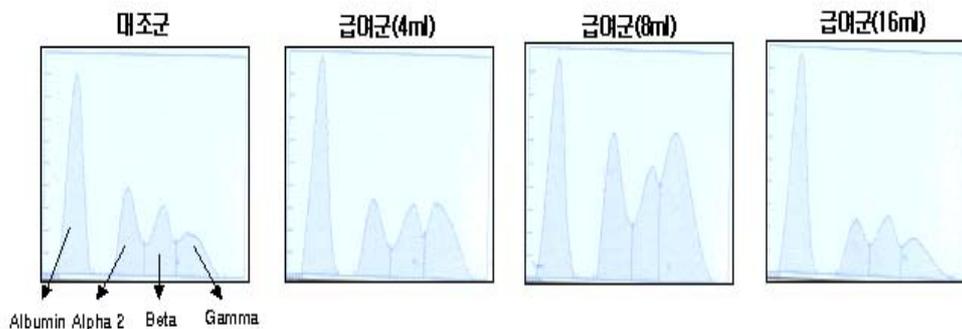


Fig. 19. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng(TCM-KWG) on protein in serum of pigs.

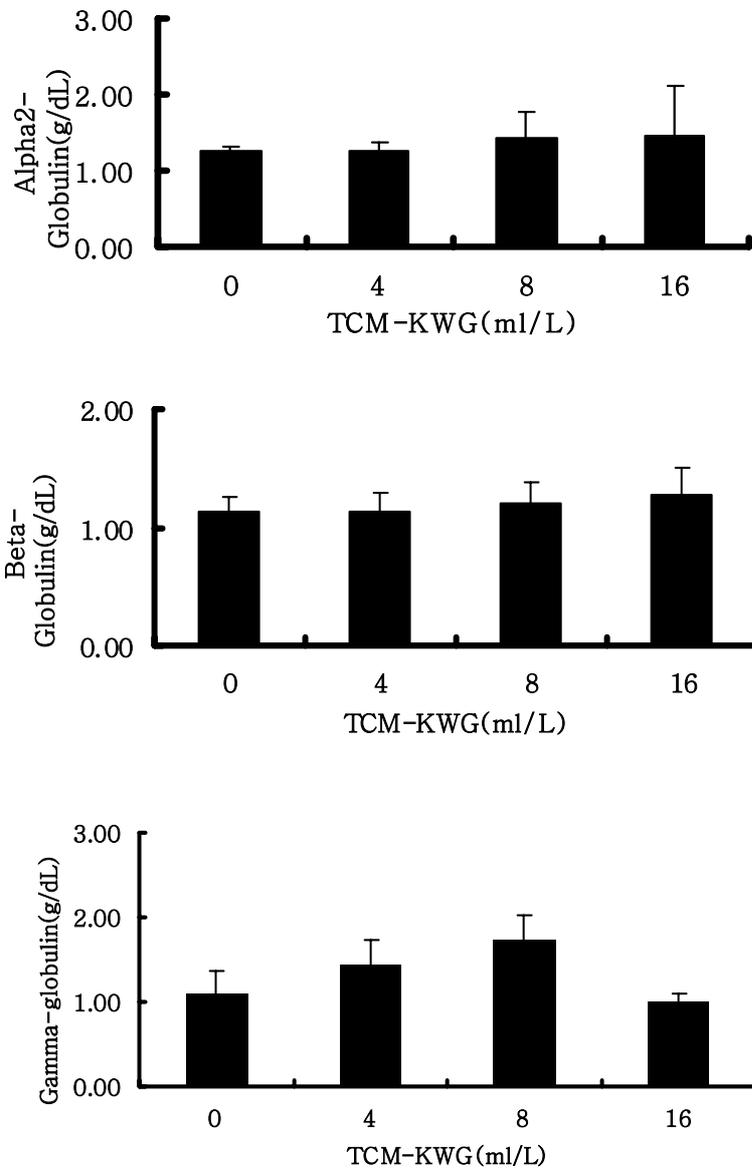


Fig 20. Effect of feeding Tissue Culture Medium Waste after Harvest of Korean Wild Ginseng (TCM-KWG) on globulin in serum of pigs.

제 3 세부과제 : Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여로 축산물의 조직별 단백질 발현 양상 분석

1. 계육의 단백질 발현 양상 분석

가. 산삼배양액 투여군과 대조군의 조직별 이차원 전기영동

시료채취는 재료 및 방법에 서술한바와 같이 가슴살과 다리살의 일정한 부위에서 동일한 크기로 채취하였다.

pH 3-10으로 실험한 결과 총 9100개의 spot들을 count 할 수 있었고, 이들을 분자량에 따라 번호를 지정하였다.



Fig. 21. Sample isolation for 2-DE analysis in chicks

나. Image Analysis

이차원 전기영동의 결과를 분석하였다(Fig. 22, 23). 특히 가슴살 및 다리살에서 증가하거나 감소하는 것으로 나타난 spot을 검색하여 같은 경향을 보이는 spot을 선택하였다. 그 결과 34개의 spot을 확인할 수 있었다.

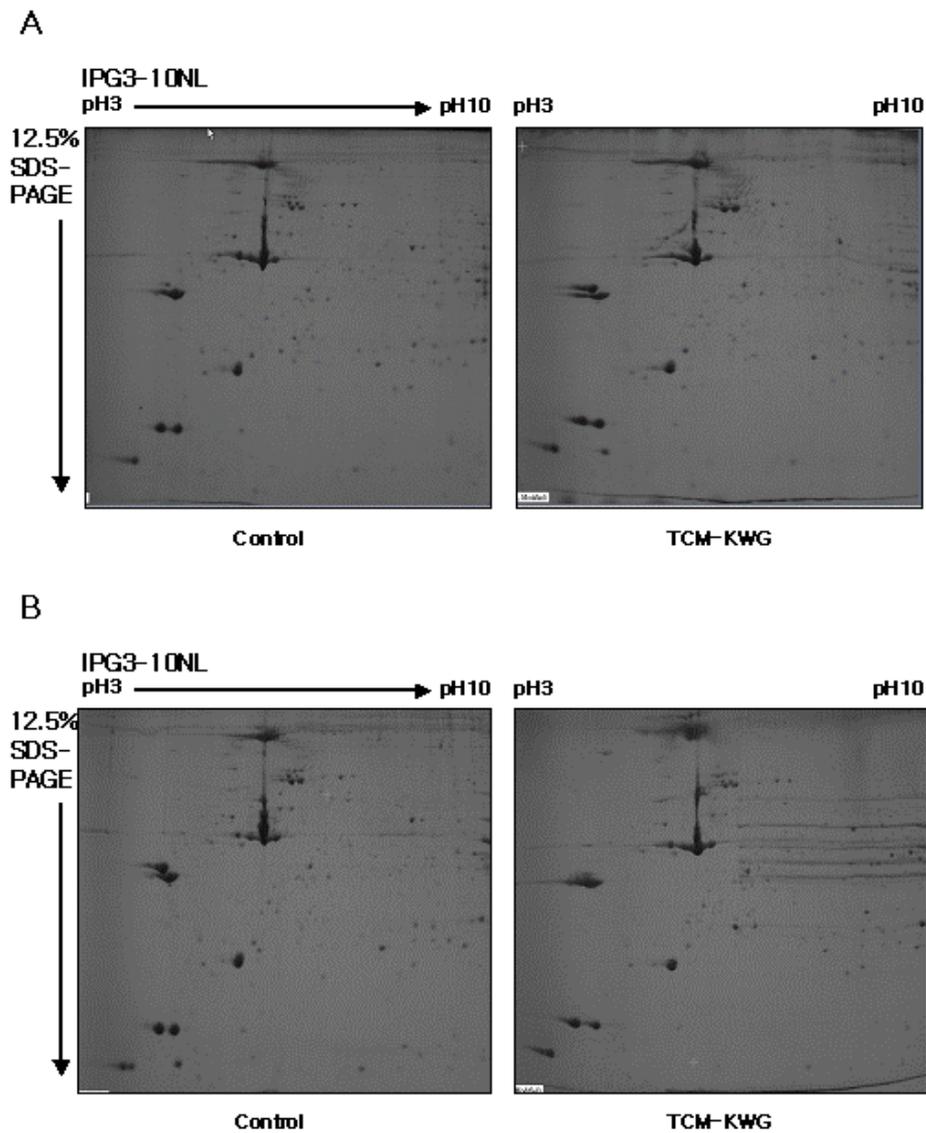


Fig. 22. 2-DE map of protein from control groups and TCM-KWG treatment groups in fibularis longus muscle(A) and superficial pectoral muscle(B). Proteins were separated using an IPG 3-10 NL in the first dimension and 12.5% SDS gel in the second dimension. The protein loading was 400 μ g and the gel was stained with coomassie blue G-250.

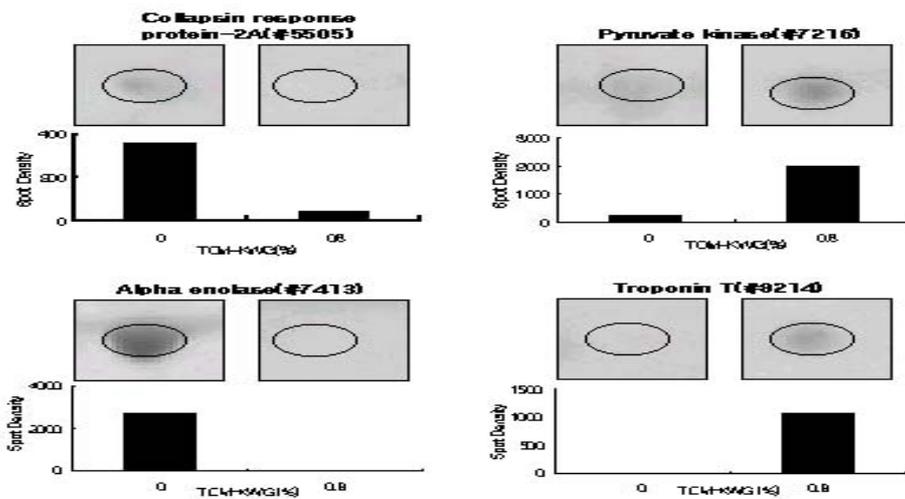


Fig. 23. Expression profiles of 10 spots between control groups and TCM-KWG treatment groups in fibularis longus muscle and superficial pectoral muscle. An arrows show the relative spot density change in control group(0%) and TCM-KWG treatment group(0.8%). The bars represent the average density based on observation in three chickens.

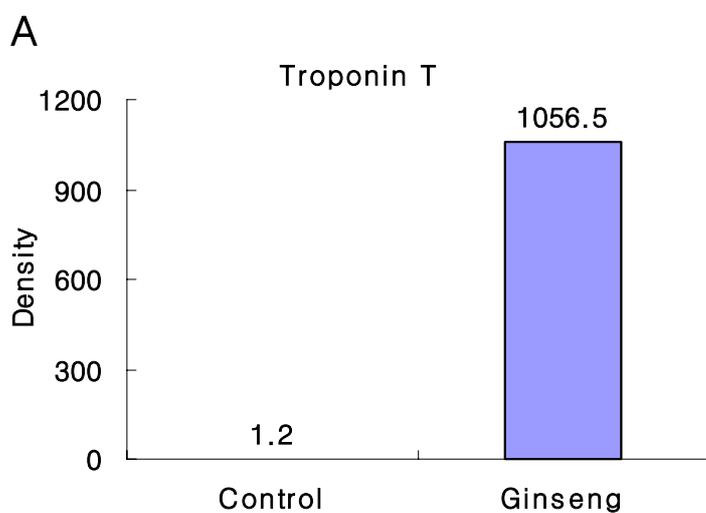
다. MALDI-TOF 분석결과

이미지 분석을 통하여 변화가 확인된 34종의 spot을 MALDI-TOF 분석한 결과 10 종의 단백질을 확인할 수 있었다 (Table. 40).

동정된 단백질을 그 기능으로 분류해보면, Alpha-actin과 Troponin-T는 그 발현이 저하 되었을 때 육류 색이 창백하고 조직이 흐물거리며 육즙이 많은 경향을 보이는 것으로 알려져 있다. 산삼배양액 투여군에서는 Alpha-actin과 Troponin-T의 발현이 대조군에 비하여 현저히 증가되는 것으로 나타났다 (Fig. 24A, B, C). Troponin-T의 경우엔 가슴살에서 1000배 정도의 발현량 증가를 보였다. 본 연구 결과는 산삼배양액 투여군은 대조군에 비해 육질의 색이 창백하고 흐물거리며 육즙이 많은 경향이 덜할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 해당과정 및 에너지 생성에 관여하는 Pyruvate kinase의 발현도 현저히 증가되어 산삼배양액 투여군에서 근육세포의 ATP 생성을 증가시킬 수 있을 것으로 판단되며, 증가된 ATP의 생성은 사후강직의 지연으로 이어질 수 있을 것이다. 또한 heat shock protein-25 인 actin polymerization inhibitor의 발현량 감소를 확인할 수 있었다.

Table 40. Identified proteins by proteomics in Ginseng-treated chicken tissues

Spot Number	Protein Name	Density			
		Breast		Drum stick	
		Control	Ginseng	Control	Ginseng
1317	Desmin	1241.5	241.5	381.7	73.3
2114	Myosin light chain 1	147.6	88.8	1700	228.2
5001	Actin polymerization inhibitor	282.6	1.6	244.7	129.2
5505	Collapsin response protein-2A	356.5	44.6	795.3	236.4
7413	Alpha enolase	4716.3	2244.8	2706.1	1.2
1411	Vimentin	196.6	322.1	418.2	828.6
4213	alpha-actin	279.6	658.5	444.2	582.2
5109	My023 protein	378.3	665.2	220.3	315
7216	Pyruvate kinase	229	1948.2	292.2	465.6
8214	Troponin T	1.2	1056.5	174.2	379.1



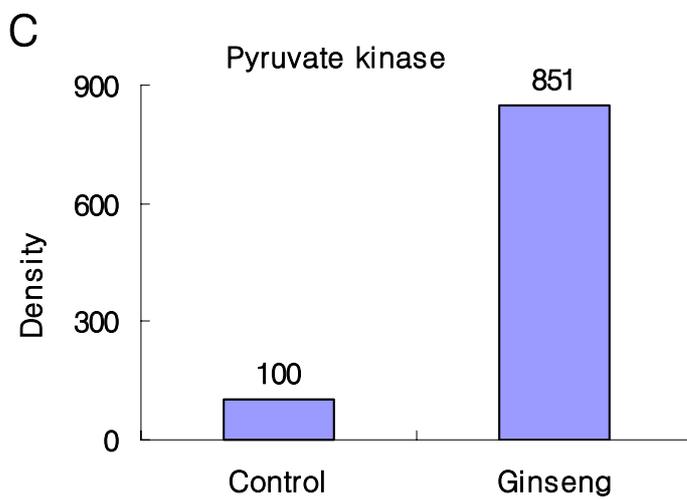
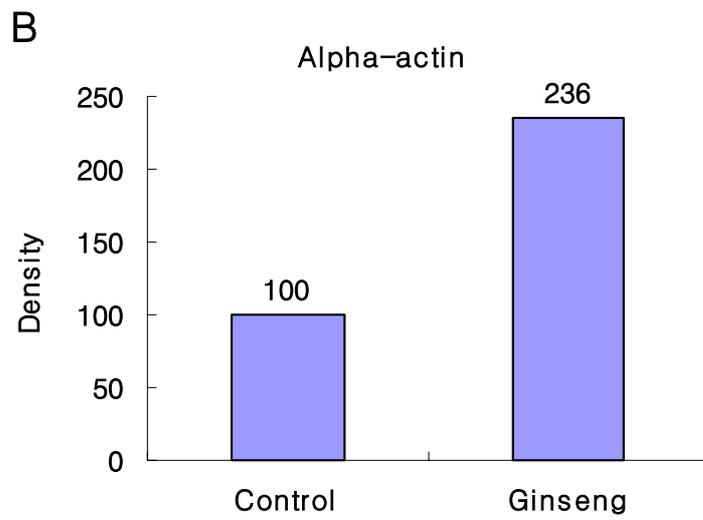


Fig. 24. The density of Troponin-t, Alpha-actin and Pyruvate kinase in ginseng-treated chicken breast muscle

2.. 돈육의 단백질 발현 양상 분석

가. 산삼배양액 투여군과 대조군의 조직별 이차원 전기영동

시료채취는 실험 종료후 대조군과 실험군(16ml/ℓ)의 등최장근(*longissimus dorsi muscle*)에서 채취하였다. 채취한 근육에 buffer를 적당량 넣고 homogenizer를 이용하여 조직을 갈아 30분간 incubation 후에 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취하고 TCA solution을 넣은 후 16,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 ethyl ether로 2회 wash 해 주고 침전물이 완전히 마르면 lysis buffer(7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 30mM DTT, 2% IPG buffer)를 넣고 상온에서 1시간동안 incubation 한 후에 16,000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 시료의 최종 단백질 농도가 3~10mg/ml이 되도록 Bradford 방법을 이용하여 단백질을 정량한 후 희석였다. 준비된 시료를 각각 300ug을 cup loading 방법에 따라 loading 한 후 IPG phore(Amersham Pharmacia Biotech 사)를 사용하여 isoelectro focusing을 하였다. Focusing이 끝난 strip을 equilibration solution(50mM Tris-HCl, pH6.8, 6M urea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 2% v/v DTT and a trace of bromopheno blue bye) 에서 15분간 처리한 다음, polyacrylamide gradient slab gel(160 x 200 x 1.0 mm, 10 - 16% acrylamide monomer, 2.6 % bis-acrylamide crosslinker)에 올린 뒤, sealing agarose (0.5% agarose, Tris-glycine-SDS at pH8.3, at 25 mM Tris, 198 mM glycine and 0.1% SDS)를 사용하여 sealing하고 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 다음 AgNO₃ solution(0.2% AgNO₃, 0.02% HCOH)을 사용하여 젤을 염색한 후 Densitometer 800(Bio-Rad사)을 사용하여 아래 그림과 같이 SDS-PAGE의 이미지를 얻었다(Fig. 25).

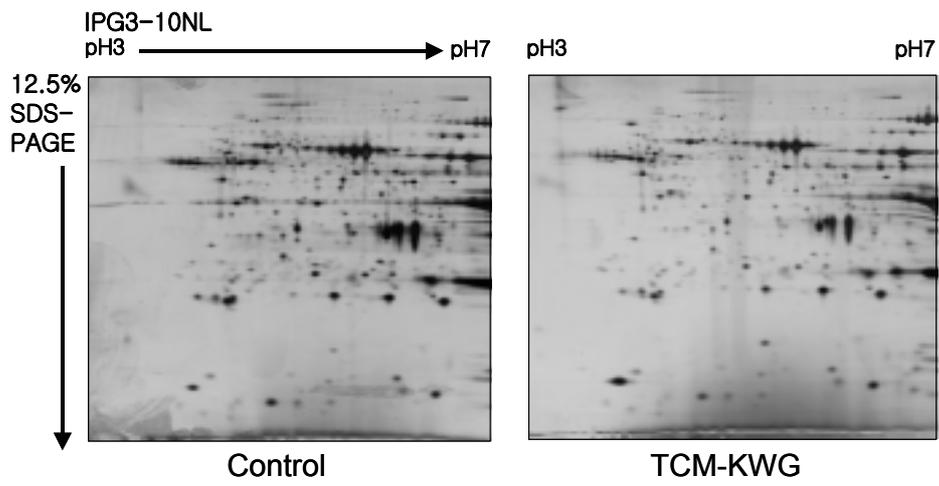


Fig 25. 2-DE map of protein from control groups and TCM-KWG treatment groups in longissimus dorsi muscle of pig.

나. Image Analysis

이차원 전기영동을 통해 단백질을 젤 상에서 분리한 후 PDQuest(Bio-Rad, CA) 분석 소프트웨어를 사용하여 대조군에 비해 산삼배양액의 급여군에서 유의성 있게 증가하거나 감소하는 경향을 보이는 spot을 선정한 결과 총 3개의 spot을 확인할 수 있었다. Spot1902의 density는 대조군에 비해 산삼배양액 급여군에서 약 6.5배 증가하였으며, spot4113의 density도 산삼배양액 급여군에서 약 7.2배 증가하였다. 그러나 spot4602의 density는 대조군 보다 산삼배양액 급여군에서 약 4.7배 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 26).

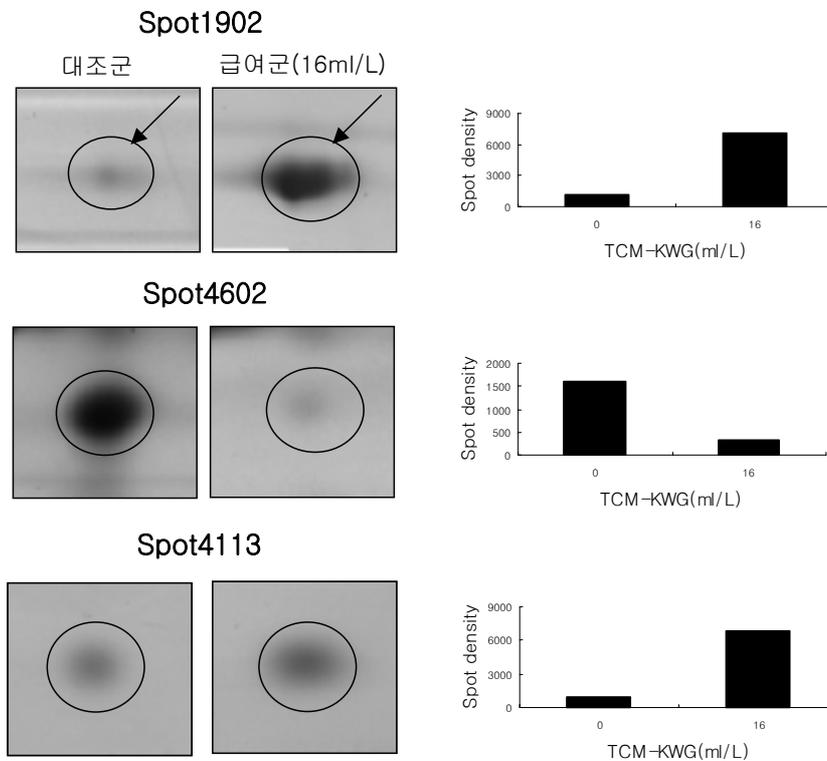


Fig. 26. Expression profile of 3 spots between control groups and TCM-KWG in longissimus dorsi muscle of pig.

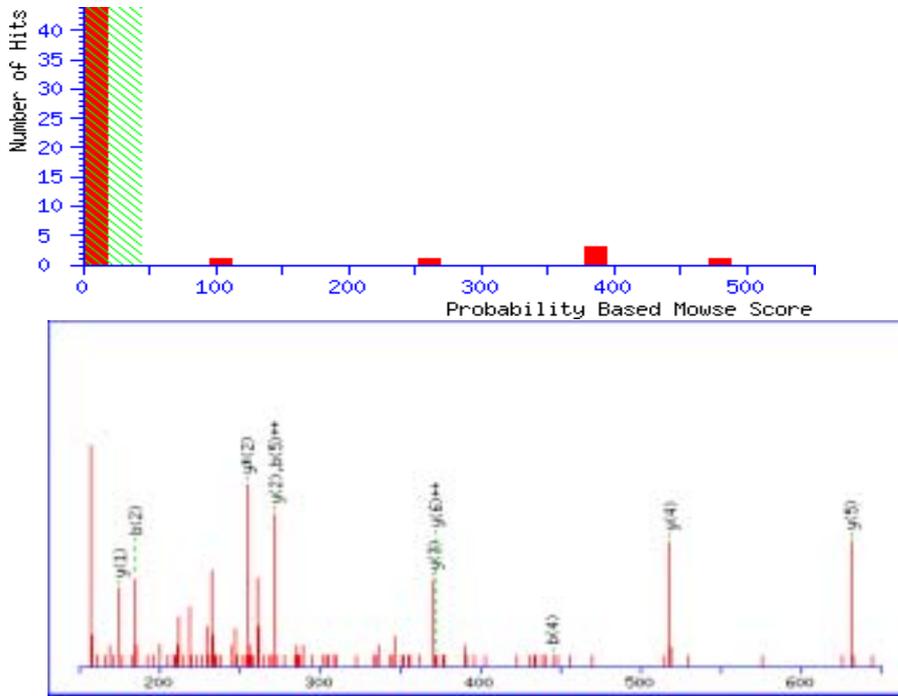
다. Protein Identification

이미지 분석을 통하여 변화가 확인된 3종의 단백질들을 동정하기 위하여 spot들을 절단하고 200ul DDW에 넣어 10분간 상온에서 보관한 후 in gel digestion을 실시하였다. 첫 번째는 silver stain 된 젤의 destain 방법으로 DDW를 제거 하고, 30mM potassium ferricyanide solution, 100mM sodium thiosulfate solution을 1:1(v/v) 섞은 후 넣었다. 은 염색이 완전히 사라지면, DDW로 3회 vortexing 한 후 200mM ammonium bicarbonate, (pH7.8)을 100ul 넣고 상온에서 20분간 보관 하였다. 보관 된 용액을 제거하고, 200ul acetonitrile 용액을 넣고, 5분간 vortexing 하였다. 보관 된 용액을 제거하고, 0.1M ammonium bicarbonate (pH7.8)를 200ul 넣고, 5분간 vortexing 하였다. 보관 된 용액을 제거하고, 200ul acetonitrile 용액을 넣고, 5분간 vortexing 을 2회 반복하여 실시하였다. 완전히 마른 젤은 200ng의 trypsin 용액을 넣고, ice에서 35분간 보관 후 E-tube 내 trypsin solution을 완전히 제거 후 50mM ammonium bicarbonate (pH 7.8)을 50ul 넣고 37℃에서 overnight incubation 하였다. 아래 그림은 이와 같이 In-gel trypsin digestion 한 뒤, ESI-MS/MS (Q-TOF2, Micromass)으로 peptide의 아미노산 서열분석을 실시하여 이차 동정을 실시한 결과이다(Fig 27, 28, 29). 산삼배양액 급여에 의하여 변화하는 3종의 단백질들을 동정한 결과 아래 그림과 같이 heat shock protein 90-alpha(spot 1902), myosin binding protein(spot 4602)과 cofilin 2(spot 4113) 등의 단백질들을 확인할 수 있었다. 단백질 생산과 관련하여, 생성된 단백질을 활성상태로 folding하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 molecular chaperone은 정상세포의 성장에도 필요하지만 단백질을 비롯한 세포내 구성성분이 손상을 받는 스트레스 상황에서 그 필요성이 증가하게 되고, 생리적 및 환경적인 다양한 스트레스 조건하에서 그 발현이 증가하게 된다. 특히 열충격시 발현이 증가되어 heat shock protein(HSP)이라 명명된 단백질이 이러한 기능을 가지고 있다. 또한 myosin binding protein은 근육내 thick

filament의 구조와 기능을 조절하는 중요한 단백질이며, myosin binding protein의 인산화로 인해 근육의 수축력에 변화를 주는 것으로 알려져 있다. 그리고 cofilin 2는 F-actin depolymerizing factor의 일종으로 actin과 결합하는 단백질이며, actin filament에 tropomyosin의 결합을 차단하며 tropomyosin은 actin filament에 cofilin이 결합함으로써 actin filament로부터 분리된다.

이상에서 산삼배양액 급여에 의한 heat shock protein 90과 같은 단백질의 변화는 자돈이 외부에 대한 생리적, 환경적 스트레스 상태에 노출시 스트레스에 대한 질병 발생이나 성장저하 등을 억제시켜줄 것으로 생각된다.

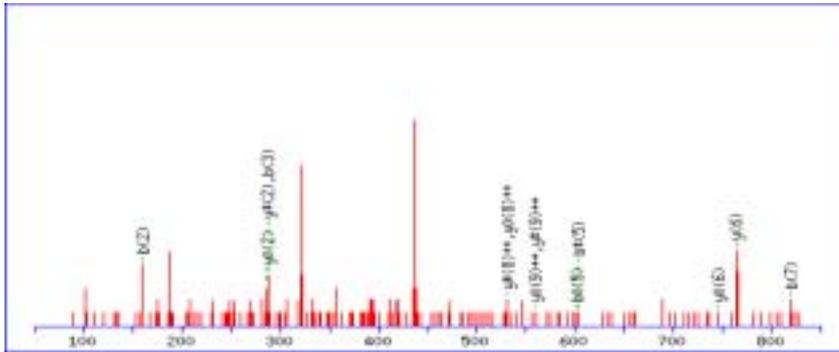
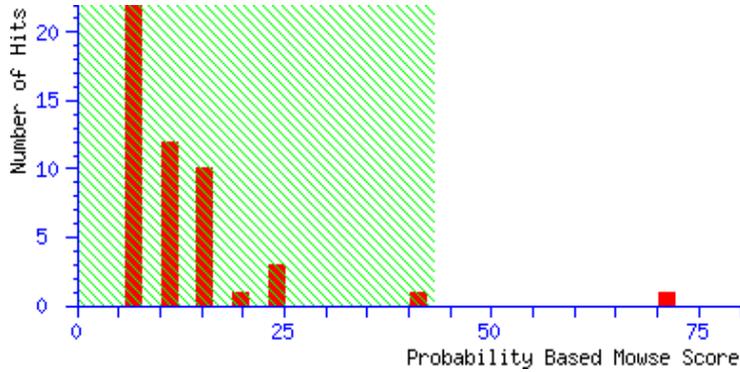
Heat shock protein 90-alpha



#	b	b ⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y*	y ⁺⁺⁺	#
1	72.04	36.53	A					7
2	185.13	93.07	L	744.48	372.74	727.45	364.23	6
3	298.21	149.61	L	631.39	316.20	614.37	307.69	5
4	445.28	223.14	F	518.31	259.66	501.28	251.14	4
5	544.35	272.68	V	371.24	186.12	354.21	177.61	3
6	641.40	321.20	P	272.17	136.59	255.15	128.08	2
7			R	175.12	88.06	158.09	79.55	1

Fig 27. Electrospray-ionization mass spectrometry (ESI-MS) profiles of heat shock protein 90-alpha

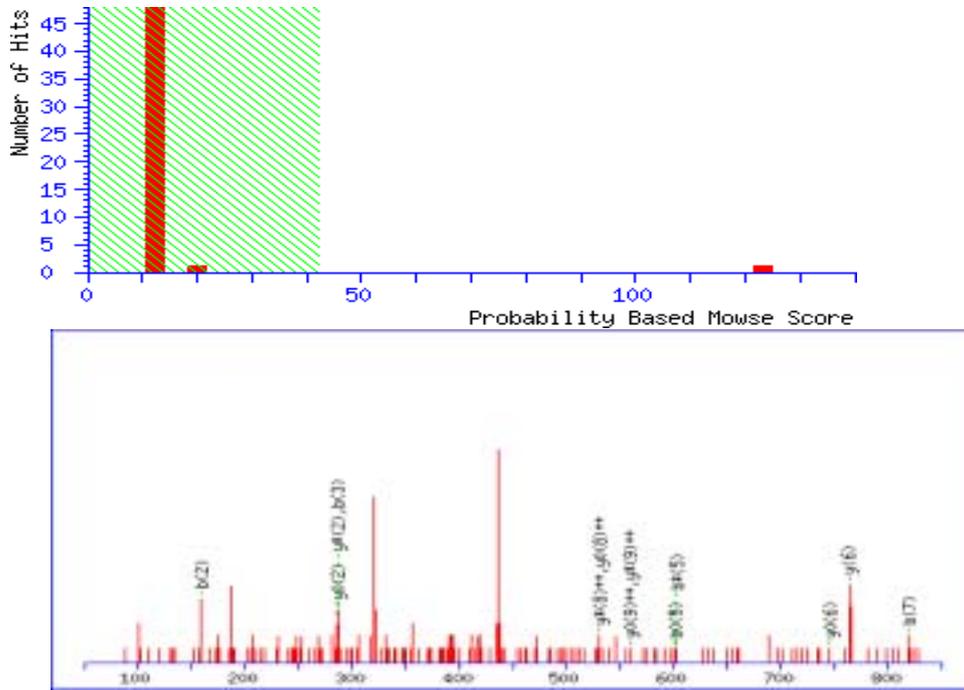
Myosin-binding protein



#	b	b ⁺⁺	b [*]	b ⁺⁺⁺	b0	b0 ⁺⁺	Se	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y0	y0 ⁺⁺	#
1	102.05	51.53			84.04	42.53	1							10
2	159.08	80.04			141.07	71.04	(1135.59	568.30	1118.56	559.79	1117.58	559.29	9
3	287.13	144.07	270.11	135.56	269.12	135.07	(1078.57	539.79	1061.54	531.27	1060.56	530.78	8
4	473.21	237.11	456.19	228.60	455.20	228.11	v	950.51	475.76	933.48	467.25	932.50	466.75	7
5	620.28	310.64	603.26	302.13	602.27	301.64	I	764.43	382.72	747.40	374.21	746.42	373.71	6
6	721.33	361.17	704.30	352.66	703.32	352.16	1	617.36	309.18	600.34	300.67	599.35	300.18	5
7	820.40	410.70	803.37	402.19	802.39	401.70	v	516.31	258.66	499.29	250.15	498.30	249.66	4
8	933.48	467.25	916.46	458.73	915.47	458.24	I	417.25	209.13	400.22	200.61	399.24	200.12	3
9	1062.53	531.77	1045.5	523.25	1044.51	522.76	I	304.16	152.58	287.13	144.07	286.15	143.58	2
10							I	175.12	88.06	158.09	79.55			1

Fig 28 . Electrospray-ionization mass spectrometral(ESI-MS) profiles of myosin-binding protein

Cofilin 2



#	b	b ⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	164.07	82.54			Y							11
2	235.11	118.06			A	1174.56	587.78	1157.54	579.27	1156.55	578.78	10
3	348.19	174.60			L	1103.53	552.27	1086.50	543.75	1085.51	543.26	9
4	511.26	256.13			Y	990.44	495.72	973.41	487.21	972.43	486.72	8
5	626.28	313.64	608.27	304.64	D	827.38	414.19	810.35	405.68	809.37	405.19	7
6	697.32	349.16	679.31	340.16	A	712.35	356.68	695.32	348.17	694.34	347.67	6
7	798.37	399.69	780.36	390.68	T	641.31	321.16	624.29	312.65	623.30	312.16	5
8	961.43	481.22	943.42	472.21	Y	540.27	270.64	523.24	262.12	522.26	261.63	4
9	1090.47	545.74	1072.46	536.73	E	377.20	189.11	360.18	180.59	359.19	180.10	3
10	1191.52	596.26	1173.51	587.26	T	248.16	124.58	231.13	116.07	230.15	115.58	2
11					K	147.11	74.06	130.09	65.55			1

Fig 29 . Electrospray-ionization mass spectrometral(ESI-MS) profiles of cofilin2

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 축산물의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 규명

1. 닭고기와 계란의 품질에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명

산삼배양액 투여군과 대조군에서 닭고기와 계란의 품질에 미치는 산삼 배양액의 효과를 규명하기 위하여, 닭고기의 일반성분, 물리 화학적인 성분 분석, 이화학적인 특성을 분석하고, 계란의 품질 변화를 분석하였다. 본 연구 결과로서 대조군과 산삼배양액 투여군의 가슴살을 이용한 일반성분 분석 결과 조회분(Crude Ash) 함량의 증가를 보였으며 이는 계란의 난각형성에 영향을 미쳐, 난각 두께가 대조군에 비하여 산삼배양액 투여군에서 현저한 증가를 보였다. 이러한 난각 강도 및 두께의 증가는 계란의 이동시 발생할 수 있는 난각 균열을 감소시키고, 미생물의 침입을 방어할 수 있으므로, 계란의 보존성 및 상품성을 높여 계란의 품질을 높여 줄 수 있을 것이며 생산성 향상에 도움을 줄 것으로 판단된다. 또한 산삼배양액 투여군 조직의 pH는 대조군에 비해 유의성 있는 감소 경향을 보였으며, 이는 육제품에서 미생물의 번식을 억제하고 보존이나 내구성을 강화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 1세부 과제 목표는 달성되었다고 사료된다.

2. 돈육의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과 평가

산삼배양액 투여군과 대조군에서 돈육의 품질에 미치는 산삼 배양액의 효과를 규명하기 위하여, 돈육의 일반성분, 물리 화학적인 성분 분석, 이화학적인 특성을 분석하였다. 산삼 배양액을 급여한 자돈과 대조군의 근육 내 일반

성분을 분석한 결과 나트륨이나 칼슘의 함량이 유의적으로 증가하였는데 이러한 미량원소는 대사 및 기타 생리적 작용에 필수적인 무기물이다. 특히 나트륨은 체액의 산. 염기의 평형유지나 삼투압 조절 등에 중요한 역할을 하며, 칼슘은 혈액응고에 필수적인 인자이며 골격의 형성과 유지에 매우 중요하다. 또한 콜레스테롤의 수치도 유의적으로 감소하였는데 콜레스테롤은 인지질과 함께 세포의 막계를 구성하는 주요성분이지만 콜레스테롤 수치가 높아지면 혈액속의 지방이 증가되면서 동맥경화가 진행되어 중풍이나 심장병 같은 성인병을 일으키기 쉽다. 또한 산삼 배양액 급여로 자돈의 근육 내 필수 지방산인 linolenic acid의 함량이 증가하였으며, EPA(eicosapentaenoic acid)와 DHA(docosahexaenoic acid)의 함량이 유의성 있게 증가하였다. Linolenic acid는 혈압, 혈당치 및 혈중 콜레스테롤 농도를 조절하며 비만증 예방, 노화 예방 및 피부 건강 유지의 효과가 있으며, 또한 EPA는 혈액의 흐름을 방해하는 나쁜 콜레스테롤이나 지방을 제거하는 기능을 하고 동맥경화, 심근 경색 및 뇌혈전등의 성인병을 예방하며, DHA는 뇌의 기능을 활발하게 하며 암의 증식을 억제해 암을 예방하고, 동맥경화에 근거하는 순환기계 질환을 예방하는 효과를 나타낸다. 이상의 결과로 산삼배양액 급여에 따른 돈육 내 성분 변화는 성인병을 예방하는 저콜레스테롤 돈육의 생산과 풍부한 미네랄과 DHA의 증가에 따른 성장기 어린이의 발육에 좋은 돈육 생산에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

제 2 절 산업동물의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명

1. 닭의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명

산삼배양액 투여군과 대조군에서 닭의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과를 규명하기 위하여 육계의 증체율 및 사료 요구율 등을 평가하였으며, 산란계의 생산성, 폐사율 및 질병 발생률 측정, 백신 항체가 측정, 혈액의 성상을 분석하였다. 또한 *Salmonella gallinarum* challenge test를 실시하여, 산삼배양액 투여군이 질병저항성을 갖는지를 평가하였으며 그 결과는 산삼 배양액 투여군에서의 폐사율이 대조군에 비해서 현저하게 감소되어 산삼배양액 투여로 인해 질병에 대한 저항성이 현저히 높아졌음을 확인할 수 있었고, 혈액의 성상 분석 결과 산삼 배양액 투여군의 혈청에서 칼슘의 양이 증가하였으며 이는 산삼배양액이 실험 동물의 골격 및 난각 형성에 영향을 미쳐, 난각 두께의 증가를 가져온 것으로 생각된다. 또한 산삼배양액 투여군의 혈청에서 인(Pi)의 양이 증가하였으며 이는 골격 형성 및 발육에 영향을 줄 것으로 생각된다. 산삼 배양액 투여로 인한 혈청 중 칼륨의 양 증가가 나타났으며 이는 체액의 항상성 유지 및 발육 촉진에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 본 2세부 연구 과제의 주요 목표는 달성되었다고 생각된다.

2. 자돈의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과 규명

산삼배양액 투여군과 대조군에서 자돈의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과를 규명하기 위하여 자돈의 증체율, 사료 요구율 및 혈액 내 조성의 변화 등을 평가하였다. 4주 동안 산삼배양액을 급여한 군의 증체량을 조사한

결과 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였고, 또한 일일 증체량도 산삼배양액 급여군이 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 또한 산삼배양액을 급여한 4주 동안 폐사된 자돈은 볼 수 없었으며, 0~1주 동안 8ml/L의 산삼배양액을 급여한 군에서 한두, 1~2주 동안 산삼배양액을 급여하지 않은 군에서 한두가 경미한 발열과 설사증상을 보였으나 바로 호전되었고 2~4주 동안은 각 급여군당 질병에 걸린 자돈은 보이지 않았다. 그리고 혈액 내 조성의 변화를 조사한 결과 칼슘의 양과 혈장 내 단백질 중 면역에 관련된 글로불린이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 칼슘(Ca^{2+})은 골격의 형성과 유지를 위해 매우 중요한 역할을 하며 또한 혈액 응고에 필수적인 요소이다. 또한 혈장중의 모든 감마글로불린과 알파 및 베타글로불린의 일부는 항원에 대한 항체를 형성하여 체액성 면역의 주체가 된다. 본 연구 결과 산삼배양액의 급여로 인한 자돈의 증체량 증가와 혈청 내 칼슘의 농도 증가는 이유 자돈의 골격형성 및 발육촉진에 영향을 끼쳐 생산성 증대에 도움을 줄 것으로 생각되며, 면역글로불린의 증가는 이유자돈의 면역력 강화에 따른 질병 저항성의 증가에 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다.

제 3 절 Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 동물 의 조직별 단백질 발현 양상 분석

1. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 닭의 조직별 단백질 발현 양상 분석

산삼배양액 투여군과 대조군의 조직별 단백질 발현 양상을 분석하기 위하여 이차원 전기영동을 실시하고 그 결과를 이미지 분석하여 target protein을 MALDI-TOF로 분석하였다. 본 연구에서 대조군과 산삼배양액 투여군의 가슴살과 다리살의 시료를 이용하여 실시한 이차원 전기영동 및 단백질 분석을 통하여 10가지 단백질의 발현량이 현저히 변화되었음을 확인하였다. 동정된 단백질 중 Troponin-T, Alpha-actin 그리고 Pyruvate kinase 등은 육질의 고급화를 위한 필수 단백질로서의 기능과 근육내 에너지 생성의 필수 요소로서 체내에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀져 있어 산삼배양액 투여군의 육질이 대조군에 비해 고급화 될 것으로 사료된다. 따라서 본 3세부과제의 연구개발 목표는 모두 달성된 것으로 판단된다.

2. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여 자돈의 조직별 단백질 발현 양상 분석

산삼배양액 투여군과 대조군의 조직별 단백질 발현 양상을 분석하기 위하여 이차원 전기영동을 실시하고 그 결과를 이미지 분석하여 target protein을 분석하였다. 대조군과 실험군의 등최장근(*longissimus dorsi muscle*)에서 시료를 채취하여 전기영동한 후에 이미지 분석을 통하여 변화된 3종의 단백질을 확인하고 ESI-MS/MS (Q-TOF2, Micromass사)으로 peptide의 아미노산 서열분석을 하여 이차 동정을 실시한 결과 heat shock protein

90-alpha(spot 1902), myosin binding protein(spot 4602)과 cofilin 2(spot 4113) 등의 단백질들을 확인할 수 있었다. 이중에서 heat shock protein은 단백질 생산성과 관련하여 생성된 단백질의 활성상태로 folding하는데 중요한 역할을 하는 molecular chaperone의 일종인데 이는 정상세포의 성장에도 필요하지만 단백질을 비롯한 세포내 구성성분이 손상을 받는 스트레스 조건에서 그 발현이 증가하게 되는 단백질로 체내 방어에 필수적인 요소이다. 산삼배양액 급여에 의한 자돈 내 근육의 이 단백질의 증가는 자돈이 외부에 대한 생리적, 환경적 스트레스 상태에 노출시 스트레스에 대한 질병 발생이나 성장저하 등을 억제시켜줄 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 닭고기와 계란의 품질에 미치는 산삼 배양액의 효과

본 연구 결과로서 대조군과 산삼배양액 투여군의 가슴살을 이용한 일반 성분 분석 결과 조희분 함량의 증가를 보였으며 이는 계란의 난각형성에 영향을 미쳐, 난각 두께가 대조군에 비하여 산삼배양액 투여군에서 현저한 증가를 보였다. 이러한 난각 강도 및 두께의 증가는 계란의 이동시 발생할 수 있는 난각 균열 및 파괴를 감소시킬 수 있으며, 미생물의 침입을 방어할 수 있어 보존성 및 상품성이 높은 고품질의 계란 개발 및 양계 농장의 생산성 향상에 기여할 수 있을 것이다.

2. 돈육의 품질에 미치는 산삼배양액의 효과

본 연구 결과 콜레스테롤의 수치가 산삼배양액을 급여한 군의 돈육에서 약 4% 정도 감소하였는데, 콜레스테롤은 인지질과 함께 세포의 막계를 구성하는 주요성분이지만 콜레스테롤 수치가 높아지면 혈액속의 지방이 증가되면서 동맥경화가 진행되어 중풍이나 심장병 같은 성인병을 일으키기 쉽다. 따라서 본 연구결과를 활용한다면, 저콜레스테롤 돈육의 개발에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

3. 닭의 생산성에 미치는 산삼 배양액의 효과

본 연구결과 중 *Salmonella gallinarum*을 이용한 challenge test 결과는 산삼배양액 투여군이 *Salmonella*에 대한 저항성을 갖는 것으로 평가되었다.

이는 산삼배양액의 사료첨가물로서의 개발이 양계 농장의 생산성 향상에 큰 기여를 할 수 있을것으로 판단되며, 개발의 필요성과 당위성을 부여할 수 있을 것이다.

4. Proteomics를 이용한 산삼배양액 급여후 단백질 발현 양상 분석

본 연구에서 산삼배양액 급여에 의해 발현량의 많은 증가를 보이는 단백질들은 Troponin-T, Alpha-actin, heat shock protein, cofilin 2 그리고 Pyruvate kinase 등 이었으며, 육질의 고급화를 위한 필수 단백질로서의 기능과 근육내 에너지 생성의 필수 요소로서 체내에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀져 있어 고품질 축산물 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 heat shock protein은 정상세포의 성장에도 필요하지만 단백질을 비롯한 세포내 구성성분이 손상을 받는 스트레스 조건에서 그 발현이 증가하게 되는 단백질로 체내 방어에 필수적인 요소이며, 그 발현량의 증가는 외부에서의 생리적 및 환경적 스트레스에 노출시 그에 대한 질병 발생이나 성장저하 등을 억제시켜줄 수 있을것이며, 생산성 향상을 도모할 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

산삼(Korean wild ginseng, panax ginseng)은 오래전부터 의학적으로 그 효용성이 증명되었으며 최근에는 첨단 생명공학기술을 응용하여 산삼을 실험실에서 조직 배양시키는 기술이 국내 연구자들에 의해 개발되었다. 산삼배양액(The tissue culture medium waste after harvest of Korean wild ginseng(TCM-KWG))이란 조직배양을 통해 실험실에서 배양시킨 산삼을 분리하고 남은배양액을 의미한다. 이 산삼배양액에는 사포닌 성분외에 많은 성분들이 다량 함유되어 있음이 발견되었다. 산삼배양액에서 가장 많은 성분으로 알려져 있는 사포닌의 효능과 관련된 연구 결과는 많이 발표되어 있는데[De Combarieu E등, 2003., Gosse B등, 2002., Kim CS등, 2002., Santos WR등, 2002], 면역기능 증강작용, 암세포 증식 억제작용, 항염증작용 그리고 단백질 합성 촉진작용 등의 효능과 다양한 작용들을 보인다 [Bucci LR등, 2000., Gillis CN등, 1997., Scaglione F등, 1990., Yun TK등, 2003]. 또한 세포내에서 면역기능을 담당하고 있는 세망내피계 기능을 면역억제 약물 투여 등으로 저하시켜 놓은 다음 사포닌을 투여하였더니 세망내피계 기능이 정상으로 회복되었다는 결과[Grover AK등, 1997., Hedman K등, 1976]와 인삼의 면역기능 항진효능에 대한 연구결과 등은 사포닌의 면역력 향상의 기능을 보여주는 결과이다[Hu S 등, 2003]. 또한 조직의 퇴행성 변화에 중요한 역할을 하는 활성산소종(hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide)의 유해 작용을 인삼 함유 비사포닌 성분이 억제한다는 보고가 있으며, 이는 산소에 대한 인삼의 소진 효과에 기인한다고 했다[Kim CS등, 2002., Rivera E등, 2003].

산삼배양액을 급여한 축산물의 조직내 단백질들의 동정과 변화를 프로테오믹스(proteomics)라는 분석기술을 이용하여 실시하였다. 프로테오믹스(proteomics)는 단백질체의 기능이상과 구조변형 유무 등을 가려내는 분석기술

을 뜻하는 것으로 특정 단백질의 발현 양상의 변화, post-translational modification, 다른 단백질간의 상호작용과 단백질 전체 수준에서의 구성 및 기능 등을 연구하여 세포내 변형과정과 네트워크 형성을 질병의 진행과정과 연계시켜 총괄적으로 이해 할 수 있는 연구 분야이다[Blackstock WP 등, 1999, Washinger VC 등, 1995, Wilkins MR 등, 1996]. 이차원전기영동 (Two-dimensional electrophoresis; 2-DE)은 한 개체내에서 발현되는 단백질의 발현 양상과 생리적, 환경적 변화에 따른 발현정도의 변화도 관찰할 수 있다[Rabilloud T 등, 2002, Yan JX 등, 2001]. 또한 분석 대상 단백질들을 세포의 특정 생리 조건에 따라 제조하여 특정한 spot들의 양적인 변화를 보이는 단백질들을 적당한 크기로 잘라 The matrix-assisted laser desorption ionization time of flight(MALDI-TOF) mass spectrometry(MS)등의 단백질 질량 분석기로 분석하여 아미노산 서열을 결정하고 단백질의 정체를 확인할 수 있다. 이러한 분석기술로 인해 현재 proteomics는 gene과 protein의 기능을 규명할 수 있고, protein molecule들 사이의 기능적 연결고리를 이해할 수 있을 뿐만 아니라 체내 생물학적 기능의 변화를 추적 분석하는데 아주 좋은 방법으로 인식되고 있다[Zhu 등, 2003 Jungblut 등, 1999]

제 7 장 참고문헌

Ahmed N, Rice GE. Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005, 815, 39-50.

Almeida JS, Stanislaus R, Krug E, Arthur JM. Normalization and analysis of residual variation in two-dimensional gel electrophoresis for quantitative differential proteomics. *Proteomics.* 2005, 5, 1242-1249.

Baczek T. Fractionation of peptides in proteomics with the use of pI-based approach and ZipTip pipette tips. *J Pharm Biomed Anal.* 2004, 34, 851-860.

Bai CX, Sunami A, Namiki T, Sawanobori T, Furukawa T. Electrophysiological effects of ginseng and ginsenoside Re in guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* 2003, 476, 35-44.

Bai CX, Takahashi K, Masumiya H, Sawanobori T, Furukawa T. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes. *Br J Pharmacol.* 2004, 142, 567-575.

Bailey JL, Tardif S, Dube C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Lefievre L, Leclerc P. Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm. Kinase activity and capacitation. *Theriogenology.* 2005, 63, 599-614.

Balyasnikova IV, Metzger R, Franke FE, Danilov SM. Monoclonal antibodies to denatured human ACE (CD 143), broad species specificity, reactivity on paraffin sections, and detection of subtle conformational changes in the C-terminal domain of ACE. *Tissue Antigens*. 2003, 61, 49-62.

Beynon RJ. The dynamics of the proteome: strategies for measuring protein turnover on a proteome-wide scale. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2005, 3, 382-390.

Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. 1999, 17, 121-127.

Brenna JT. Natural intramolecular isotope measurements in physiology: elements of the case for an effort toward high-precision position-specific isotope analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2001, 15, 1252-1262.

Bucci LR. Selected herbals and human exercise performance. *Am J Clin Nutr*. 2000, 72, 624S-636S.

Burgess SC. Proteomics in the chicken: tools for understanding immune responses to avian diseases. *Poult Sci*. 2004, 83, 552-573.

Burgess SC, Young JR, Baaten BJ, Hunt L, Ross LN, Parcels MS, Kumar PM, Tregaskes CA, Lee LF, Davison TF. Marek's disease is a natural model for lymphomas overexpressing Hodgkin's disease antigen (CD30). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101, 13879-13884.

Chen X, Salwinski S, Lee TJ. Extracts of Ginkgo biloba and ginsenosides exert cerebral vasorelaxation via a nitric oxide pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997, 24, 958-959.

Chichester C, Nikitin F, Ravarini JC, Lisacek F. Consistency checks for characterizing protein forms. *Comput Biol Chem*. 2003, 27, 29-35

Churchill JD, Gerson JL, Hinton KA, Mifek JL, Walter MJ, Winslow CL, Deyo RA. The nootropic properties of ginseng saponin Rb1 are linked to effects on anxiety. *Integr Physiol Behav Sci*. 2002, 37, 178-187.

Cox JC, Ellington AD. Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorg Med Chem*. 2001, 9, 2525-2531.

De Combarieu E, Fuzzati N, Lovati M, Mercalli E. Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Fitoterapia*. 2003, 74, 583-591.

de Venevelles P, Chich JF, Faigle W, Loew D, Labbe M, Girard-Misguich F, Pery P. Towards a reference map of *Eimeria tenella* sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Parasitol*. 2004, 34, 1321-1331.

Doherty MK, McClean L, Edwards I, McCormack H, McTeir L, Whitehead C, Gaskell SJ, Beynon RJ. Protein turnover in chicken skeletal muscle: understanding protein dynamics on a proteome-wide scale. *Br Poult Sci*. 2004, 45 Suppl 1, S27-28.

Doherty MK, McLean L, Hayter JR, Pratt JM, Robertson DH, El-Shafei A, Gaskell SJ, Beynon RJ. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics*. 2004, 4, 2082-2093.

Doherty MK, Whitehead C, McCormack H, Gaskell SJ, Beynon RJ. Proteome dynamics in complex organisms: using stable isotopes to monitor individual protein turnover rates. *Proteomics*. 2005, 5, 522-533.

Ellederova Z, Halada P, Man P, Kubelka M, Motlik J, Kovarova H. Protein patterns of pig oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod*. 2004, 71, 1533-1539.

Galvani M, Hamdan M, Herbert B, Righetti PG. Alkylation kinetics of proteins in preparation for two-dimensional maps: a matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry investigation. *Electrophoresis*. 2001, 22, 2058-2065.

Gerrits RJ, Lunney JK, Johnson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer GA, Dobrinsky JR. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*. 2005, 63, 283-299.

Gillis CN. Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link? *Biochem Pharmacol*. 1997, 54, 1-8.

Gosse B, Gnabre J, Bates RB, Dicus CW, Nakkiew P, Huang RC. Antiviral

saponins from *Tieghemella heckelii*. *J Nat Prod.* 2002, 65, 1942–1944.

Goswami C, Dreger M, Jahnel R, Bogen O, Gillen C, Hucho F. Identification and characterization of a Ca^{2+} -sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *J Neurochem.* 2004, 91, 1092–1103.

Grover AK, Samson SE. Peroxide resistance of ER Ca^{2+} pump in endothelium: implications to coronary artery function. *Am J Physiol.* 1997, 273, C1250–1258.

Hauck SM, Suppmann S, Ueffing M. Proteomic profiling of primary retinal Muller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions. *Glia.* 2003, 44, 251–263.

Hedman K, Pastan I, Willingham MC. The organelles of the trans domain of the cell. Ultrastructural localization of sialoglycoconjugates using *Limax flavus* agglutinin. *J Histochem Cytochem.* 1986, 34, 1069–1077.

Hirschberg D, Cederlund E, Crosas B, Jonsson A, Tryggvason S, Farres J, Pares X, Bergman T, Jornvall H. N-terminal acetylation in a third protein family of vertebrate alcohol dehydrogenase/retinal reductase found through a 'proteomics' approach in enzyme characterization. *Cell Mol Life Sci.* 2001, 58, 1323–1326.

Hu S, Concha C, Lin F, Persson Waller K. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003, 91, 29–37.

Iyer S, Olivares J. Trypsin digestion of proteins on intact immobilized pH gradient strips for surface matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003, 17, 2323-2326.

Jeong CS. Effect of butanol fraction of *Panax ginseng* head on gastric lesion and ulcer. *Arch Pharm Res.* 2002, 25, 61-66.

Jin ZQ. The action of ginsenoside Re on inotropy and chronotropy of isolated atria prepared from guinea pigs. *Planta Med.* 1996, 62, 314-316.

Jung SH, Woo MS, Kim SY, Kim WK, Hyun JW, Kim EJ, Kim DH, Kim HS. Ginseng saponin metabolite suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression through inhibition of activator protein-1 and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human astrogloma cells. *Int J Cancer.* 2005,

Junghans P, Kaehne T, Beyer M, Metges CC, Schwerin M. Dietary protein-related changes in hepatic transcription correspond to modifications in hepatic protein expression in growing pigs. *J Nutr.* 2004, 134, 43-47.

Kajiwara H, Aso H, Okubo A, Yamazaki S. Inhibition of adrenaline-induced lipolysis by ginseng polypeptide and its modified peptides. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998, 62, 2065-2067.

Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A.

Chemico-pharmacological studies on saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer. II. Pharmacological part. *Arzneimittelforschung*. 1975, 25, 539-547.

Kameyama A, Kaneda Y, Yamanaka H, Yoshimine H, Narimatsu H, Shinohara Y. Detection of oligosaccharides labeled with cyanine dyes using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 2004, 76, 4537-4542.

Kang KA, Kim YW, Kim SU, Chae S, Koh YS, Kim HS, Choo MK, Kim DH, Hyun JW. G1 phase arrest of the cell cycle by a ginseng metabolite, compound K, in U937 human monocytic leukemia cells. *Arch Pharm Res*. 2005, 28, 685-690.

Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on BMP4 orthologs. *Int J Oncol*. 2005, 27, 581-585.

Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on Shisa orthologs. *Int J Mol Med*. 2005, 16, 181-185.

Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on Wnt11 gene. *Int J Mol Med*. 2005, 15, 879-883.

Kim CS, Park JB, Kim KJ, Chang SJ, Ryoo SW, Jeon BH. Effect of Korea red ginseng on cerebral blood flow and superoxide production. *Acta Pharmacol Sin*. 2002, 23, 1152-1156.

Kim HE, Oh JH, Lee SK, Oh YJ. Ginsenoside RH-2 induces apoptotic cell

death in rat C6 glioma via a reactive oxygen- and caspase-dependent but Bcl-X(L)-independent pathway. *Life Sci.* 1999, 65, PL33-40.

Kim SI, Kweon SM, Kim EA, Kim JY, Kim S, Yoo JS, Park YM. Characterization of RNase-like major storage protein from the ginseng root by proteomic approach. *J Plant Physiol.* 2004, 161, 837-845.

Kim W, Hwang S, Lee H, Song H, Kim S. Panax ginseng protects the testis against 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced testicular damage in guinea pigs. *BJU Int.* 1999, 83, 842-849.

Kudryashova EV, Visser AJ, De Jongh HH. Reversible self-association of ovalbumin at air-water interfaces and the consequences for the exerted surface pressure. *Protein Sci.* 2005, 14, 483-493.

Lee HC, Hwang SG, Lee YG, Sohn HO, Lee DW, Hwang SY, Kwak YS, Wee JJ, Joo WH, Cho YK, Moon JY. In vivo effects of Panax ginseng extracts on the cytochrome P450-dependent monooxygenase system in the liver of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed guinea pig. *Life Sci.* 2002, 71, 759-769.

Lee YH, Han H, Chang SB, Lee SW. Isotope-coded N-terminal sulfonation of peptides allows quantitative proteomic analysis with increased de novo peptide sequencing capability. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004, 18, 3019-3027.

Leung FC. New applications of low-C₀tDNA as a DNA fingerprint probe.

Electrophoresis. 1999, 20, 1762-1767.

Li HT, Shi L. [Effects of total saponins of *Panax notoginseng* on Ca^{2+} influx into myocardial cells]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1990, 11, 213-217.

Liberatori S, Canas B, Tani C, Bini L, Buonocore G, Godovac-Zimmermann J, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M, Bracci R, Pallini V. Proteomic approach to the identification of voltage-dependent anion channel protein isoforms in guinea pig brain synaptosomes. *Proteomics*. 2004, 4, 1335-1340.

Liu P, Regnier FE. An isotope coding strategy for proteomics involving both amine and carboxyl group labeling. *J Proteome Res*. 2002, 1, 443-450.

Liu P, Yin H, Xu Y, Zhang Z, Chen K, Li Y. Effects of ginsenoside Rg1 on postimplantation rat and mouse embryos cultured in vitro. *Toxicol In Vitro*. 2005,

Lopez-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto MI, Puyet A. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2005, 339, 73-82.

Mangum JE, Farlie PG, Hubbard MJ. Proteomic profiling of facial development in chick embryos. *Proteomics*. 2005, 5, 2542-2550.

McCarthy FM, Burgess SC, van den Berg BH, Koter MD, Pharr GT. Differential detergent fractionation for non-electrophoretic eukaryote cell proteomics. *J Proteome Res*. 2005, 4, 316-324.

Nam MH, Kim SI, Liu JR, Yang DC, Lim YP, Kwon KH, Yoo JS, Park YM. Proteomic analysis of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005, 815, 147-155.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 1988, 9, 255-262.

Novak S, Paradis F, Savard C, Tremblay K, Sirard MA. Identification of porcine oocyte proteins that are associated with somatic cell nuclei after co-incubation. *Biol Reprod.* 2004, 71, 1279-1289.

Ou K, Seow TK, Liang RC, Lee BW, Goh DL, Chua KY, Chung MC. Identification of a serine protease inhibitor homologue in Bird's Nest by an integrated proteomics approach. *Electrophoresis.* 2001, 22, 3589-3595.

Park S, Yeo M, Jin JH, Lee KM, Jung JY, Choue R, Cho SW, Hahm KB. Rescue of *Helicobacter pylori*-induced cytotoxicity by red ginseng. *Dig Dis Sci.* 2005, 50, 1218-1227.

Peng X, Wu Y, Chen J, Wang S. Proteomic approach to identify acute phase response-related proteins with low molecular weight in loach skin following injury. *Proteomics.* 2004, 4, 3989-3997.

Person MD, Monks TJ, Lau SS. An integrated approach to identifying

chemically induced posttranslational modifications using comparative MALDI-MS and targeted HPLC-ESI-MS/MS. *Chem Res Toxicol.* 2003, 16, 598-608.

Qureshi AA, Abuirmeileh N, Din ZZ, Ahmad Y, Burger WC, Elson CE. Suppression of cholesterologenesis and reduction of LDL cholesterol by dietary ginseng and its fractions in chicken liver. *Atherosclerosis.* 1983, 48, 81-94.

Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics.* 2002, 2, 3-10.

Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, Benahmed M, Louisot P, Lunardi J. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J Biol Chem.* 2002, 277, 19396-19401.

Rao MR, Shen XH, Zou X. Calcium antagonistic action of saponins from *Panax notoginseng* (sanqi-ginseng). *J Tradit Chin Med.* 1987, 7, 127-130.

Ren L, Emery D, Kaboord B, Chang E, Qoronfleh MW. Improved immunomatrix methods to detect protein:protein interactions. *J Biochem Biophys Methods.* 2003, 57, 143-157.

Rivera E, Daggfeldt A, Hu S. Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Immunol Immunopathol.*

2003, 91, 19-27.

Rivera E, Hu S, Concha C. Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2003, 21, 1149-1157.

Ro JY, Ahn YS, Kim KH. Inhibitory effect of ginsenoside on the mediator release in the guinea pig lung mast cells activated by specific antigen-antibody reactions. *Int J Immunopharmacol*. 1998, 20, 625-641.

Saito H, Suda K, Schwab M, Thoenen H. Potentiation of the NGF-mediated nerve fiber outgrowth by ginsenoside Rb1 in organ cultures of chicken dorsal root ganglia. *Jpn J Pharmacol*. 1977, 27, 445-451.

Santos WR, de Lima VM, de Souza EP, Bernardo RR, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2002, 21, 30-43.

Satoh K, Kase Y, Hayakawa T, Murata P, Ishige A, Sasaki H. Dai-kenchu-to enhances accelerated small intestinal movement. *Biol Pharm Bull*. 2001, 24, 1122-1126.

Scaglione F, Ferrara F, Dugnani S, Falchi M, Santoro G, Fraschini F. Immunomodulatory effects of two extracts of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Drugs Exp Clin Res*. 1990, 16, 537-542.

Shao ZH, Xie JT, Vanden Hoek TL, Mehendale S, Aung H, Li CQ, Qin Y, Schumacker PT, Becker LB, Yuan CS. Antioxidant effects of American

ginseng berry extract in cardiomyocytes exposed to acute oxidant stress. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1670, 165-171.

Shefcheck K, Yao X, Fenselau C. Fractionation of cytosolic proteins on an immobilized heparin column. *Anal Chem*. 2003, 75, 1691-1698.

Shivji M, Burger S, Moncada CA, Clarkson AB, Jr., Merali S. Effect of nicotine on lung S-adenosylmethionine and development of *Pneumocystis pneumonia*. *J Biol Chem*. 2005, 280, 15219-15228.

Smirnov IP, Zhu X, Taylor T, Huang Y, Ross P, Papayanopoulos IA, Martin SA, Pappin DJ. Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*. 2004, 76, 2958-2965.

Smolka M, Zhou H, Aebersold R. Quantitative protein profiling using two-dimensional gel electrophoresis, isotope-coded affinity tag labeling, and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2002, 1, 19-29.

Stagsted J, Bendixen E, Andersen HJ. Identification of specific oxidatively modified proteins in chicken muscles using a combined immunologic and proteomic approach. *J Agric Food Chem*. 2004, 52, 3967-3974.

Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, Leung WY, Goodman T, Schulenberg B, Hendrickson J, Beechem JM, Haugland RP, Patton WF. Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics*. 2003, 3, 1128-1144.

Sucholeiki I, Toledo-Sherman LM, Hosfield CM, Boutilier K, DeSouza LV, Stover DR. Novel magnetic supports for small molecule affinity capture of proteins for use in proteomics. *Mol Divers*. 2004, 8, 9-19.

Tachikawa E, Kudo K, Harada K, Kashimoto T, Miyate Y, Kakizaki A, Takahashi E. Effects of ginseng saponins on responses induced by various receptor stimuli. *Eur J Pharmacol*. 1999, 369, 23-32.

Takemoto Y, Ueyama T, Saito H, Horio S, Sanada S, Shoji J, Yahara S, Tanaka O, Shibata S. Potentiation of nerve growth factor-mediated nerve fiber production in organ cultures of chicken embryonic ganglia by ginseng saponins: structure-activity relationship. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1984, 32, 3128-3133.

Thevis M, Loo RR, Loo JA. Mass spectrometric characterization of transferrins and their fragments derived by reduction of disulfide bonds. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003, 14, 635-647.

Thorne GD, Hilliard GM, Paul RJ. Vascular oxygen sensing: detection of novel candidates by proteomics and organ culture. *J Appl Physiol*. 2004, 96, 802-808; discussion 792.

Vivanco F, Lopez-Bescos L, Tunon J, Egido J. [Proteomics and cardiovascular disease]. *Rev Esp Cardiol*. 2003, 56, 289-302.

Wang A, Wang CZ, Wu JA, Osinski J, Yuan CS. Determination of major

ginsenosides in *Panax quinquefolius* (American ginseng) using high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 2005, 16, 272-277.

Wang BX, Cui JC, Liu AJ. [The action of ginsenosides extracted from the stems and leaves of *Panax ginseng* in promoting animal growth]. *Yao Xue Xue Bao.* 1982, 17, 899-904.

Wang X, Kapoor V, Smythe GA. Extraction and chromatography-mass spectrometric analysis of the active principles from selected Chinese herbs and other medicinal plants. *Am J Chin Med.* 2003, 31, 927-944.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 1995, 16, 1090-1094.

Watanabe J, Oh KW, Kim HS, Takahashi M, Kaneto H. A non-opioid mechanism in the inhibitory effect of ginseng saponins on electrically evoked contractions of guinea-pig ileum and mouse vas deferens. *J Pharmacobiodyn.* 1988, 11, 453-458.

Watanabe J, Takahashi M, Kaneto H. Distinctive effect of ginseng saponins on development of morphine tolerance in guinea-pig ileum and mouse vas deferens. *J Pharmacobiodyn.* 1988, 11, 744-748.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I,

Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1996, 13, 19-50.

Wilmarth PA, Taube JR, Riviere MA, Duncan MK, David LL. Proteomic and sequence analysis of chicken lens crystallins reveals alternate splicing and translational forms of beta B2 and beta A2 crystallins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004, 45, 2705-2715.

Wong JW, Downard KM. COMPLX: a computer algorithm for the detection of protein-ligand and other macromolecular complexes in mass spectra. *J Mass Spectrom.* 2003, 38, 573-581.

Xiang H, Li R, Liu W. [Lipid peroxidation of central nerve system in aged guinea pig and antioxidation effect of the method extract from *Pegasus laternarius*]. *Zhong Yao Cai.* 2002, 25, 275-277.

Xie JT, McHendale S, Yuan CS. Ginseng and diabetes. *Am J Chin Med.* 2005, 33, 397-404.

Xiong ZG, Chen JX, Sun JJ. [Effects of *Panax notoginseng* saponins on cardiac action potentials and slow inward current]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1989, 10, 122-125.

Yan JX, Tonella L, Sanchez JC, Wilkins MR, Packer NH, Gooley AA, Hochstrasser DF, Williams KL. The *Dictyostelium discoideum* proteome--the SWISS-2DPAGE database of the multicellular aggregate (slug).

Electrophoresis. 1997, 18, 491-497.

Yan JX, Harry RA, Wait R, Welson SY, Emery PW, Preedy VR, Dunn MJ. Separation and identification of rat skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2001, 1, 424-434.

Yang SJ, Li H, Wang QJ, Takeya K. [Anti-hypoxia and anti-glucose deficiency effects of PQS on guinea pig papillary muscle in low frequency electrical stimulation]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1994, 19, 560-562, 576.

Yun TK. Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of Korean ginseng and identification of active compounds. *Mutat Res*. 2003, 523-524, 63-74.

Zhang B, Jin S, Kuang X, Yao W, Xia G, Jiang M. [Effects of Rg1 on calcium channel of guinea pig ventricular myocytes]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1999, 24, 624-626, 640.

Zhang B, Jin SA, Kuang X, Yao WX, Xia GJ, Jiang MX. [Effects of Rb1 on action potentials and force of contraction in guinea pig ventricular papillary muscles]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2003, 28, 366-368.

Zhang N, Aebersold R, Schwikowski B. ProbID: a probabilistic algorithm to identify peptides through sequence database searching using tandem mass spectral data. *Proteomics*. 2002, 2, 1406-1412.

Zhou W, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Ginsenoside Rb1 blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. *J Vasc Surg.* 2005, 41, 861-868.

Zolodz MD, Wood KV, Regnier FE, Geahlen RL. New approach for analysis of the phosphotyrosine proteome and its application to the chicken B cell line, DT40. *J Proteome Res.* 2004, 3, 743-750.