

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001045-01

보안과제(), 일반과제(●) 과제번호 108069-3

산양산삼의 유전적 감별 기술 및 이를 이용한 고기능성 제품 개발

(Development of a Genetic Diagnosis and High Functional
Products of Cultivated Wild Ginseng)

산양산삼 가공제품 개발 및 효능평가(1세부)

(Development of high functional products of cultivated wild ginseng)

산양산삼의 유전적 감별기술 개발(1협동)

(Development of a genetic diagnosis of cultivated wild ginseng)

산양산삼 가공제품의 분석 및 평가방법 개발(2협동)

(Establishment of analysis and evaluation of cultivated wild ginseng
products)

상지대학교 산학협력단

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “산양산삼의 유전적 감별 기술 및 이를 이용한 고기능성 제품 개발” 과제의
보고서로 제출합니다.

2011 년 7 월 8 일

주관연구기관명 : 상지대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 최 석 호

연 구 원 : 권 기 록

연 구 원 : 임 태 진

연 구 원 : 임 청 산

연 구 원 : 이 종 영

연 구 원 : 박 순 옥

연 구 원 : 전 은 이

연 구 원 : 강 원 모

연 구 원 : 임 혜 진

연 구 원 : 최 아 람

협동연구기관명 : 인하대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 장 준 혁

협동연구기관명 : 주식회사 지앤브이

협동연구책임자 : 차 배 천

참 여 기 업 : 천방농산 영농조합

요 약 문

I. 제 목: 산양산삼의 유전적 감별 기술 및 이를 이용한 고기능성 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구 개발의 목적

- 산양산삼 품질의 표준화를 위한 유전적 감별법을 확립하여 우수 유전자원 확보
- 우수 유전자원의 대량 재배를 통한 산양산삼 기반의 산업화 준비
- 우수 효능의 산양산삼을 이용한 제품 개발을 통한 산업화

2. 필요성

- 우수 산양산삼 자원을 대량 재배하여 이를 이용한 고 기능성 제품을 개발하여 국제적인 경쟁력을 지닌 산양산삼의 제품 및 제형 개발함.
- 이는 앞으로 한국의 농업계가 추진해야할 고 부가가치 산업임.
- 또한 전 세계의 ginseng 시장을 대한민국이 이끌어 갈 주요한 아이템임.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 유전적 감별법을 이용한 산양산삼의 품질관리 시스템 구축

: Suppressive Subtraction Hybridization (SSH) 방법을 이용하여 산양산삼에서만 특이적으로 발현하는 바이오마커 유전자를 발굴하여 확보하고 이의 분자유전학적 정체성을 규명하고 이를 올리고 뉴클레오타이드 어레이 방식을 이용하여 산양산삼 감별용 기술을 개발

2. 이를 이용하여 우수 유전자를 가진 산양산삼 종자의 검색과 산업화를 위한 유전자원 확보
3. 우수 유전자원의 대량 재배와 이를 통한 농가의 소득 증대 품목의 형성
4. 산양산삼의 산업화 기술 개발 및 품질관리 기술 개발
5. 제품의 효능 평가

IV. 연구개발결과

1. Suppressive Subtraction Hybridization (SSH) 방법을 통한 산삼의 특이 유전자탐색을 통하여 산삼에서만 특이적으로 발현하는 유전자인 p-NRT2, p-rpoC1, p-psbB 그리고 p-GAPDH 등의 유전자를 발굴하는데 성공하였음.
2. 산삼의 유전적 감별 기술에 의하여 추적된 우수 유전자원을 확보하였고, 현재 우수 유전자원을 지닌 종자를 받아하여 재배 환경을 확보하고 대량생산체제를 구성 중에 있음.

3. 인삼과 산양삼, 그리고 자연산 산삼에 대한 분석을 통한 ginsenosides 함량을 추적하였고, 산양산삼 기반의 경구용 압 치료제 개발을 위해 현재 항암효능이 높은 ginsenoside 성분을 강화하는 기술을 개발하고 있음.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

1. 인삼제품에서 수출장벽으로 작용할 수 있는 다양한 문제(잔류 농약, 중금속 오염 등)를 해결하면서 산양산삼을 기반으로 한 고기능성 건강보조제 및 항암제 개발이 가능한 제품의 개발(현재 진행 중임)
2. 인삼과 산양산삼, 그리고 자연산 산삼을 쉽게 감별할 수 있는 특이 유전자 검색 기술의 개발에 성공
 - 이를 이용하여 문란한 산삼 시장의 유통질서를 정립하고 우수 유전자원의 확보 및 대량 재배가 가능해졌음.
3. 우수 유전자원을 바탕으로 한 고품질의 산양산삼 재배를 통해 농가의 소득 증대에 기여할 수 있음.
4. 산양산삼 재배 농가의 난제 해소
5. 한국의 대표 브랜드 개발
 - 고려인삼의 명성을 우수한 효능과 자연 친화성의 장점을 가진 산양산삼을 원료로 한 이용한 맞춤형 면역 기능 강화 제제 및 항암제 개발을 통해 국민 보건에 기여
6. 남북 경제협력을 위한 한국 농림의 우수 자원 확보

SUMMARY

Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) is one of the most widely used herbal medicines in the world. It is widely accepted that wild ginseng is more active than cultivated ginseng in chemoprevention. However, little has actually been reported on the difference of wild ginseng and cultivated ginseng. This project was performed to develop the diagnostic technologies to distinguish wild ginseng from cultivated ginseng and to develop high functional products of cultivated wild ginseng.

In order to identify wild ginseng-specific genes, we used suppressive subtraction hybridization (SSH). And we successfully found some noble genes like *NRT2* gene (designated *p-NRT2*), chloroplast *rpoC1* gene (*p-rpoC1*), *p-psbB* and *p-GAPDH* which were significantly up-regulated in the wild ginseng as compared with the cultivated ginseng. RT-PCR results showed that the mRNA expression of these genes were highly up-regulated in wild ginseng compared with cultivated ginseng.

For industrial application, development of the product using the wild ginseng is researched. We paid attention to increasing the contents of the ginsenoside Rd, Rg3, and Rh2 and compound K which have the anticancer effect. This research succeeded in increasing these ginsenosides by applying the various methods, such as red ginseng production technology, enzymatic treatment, and acid treatment for decomposition technique, etc. But additional research has to be progressed in the near future. Through these researches, we expects that development of international products using wild ginseng and industrialization will be made sooner or later.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines	10
Session 1. Research Objectives	10
Session 2. Research Necessity	10
Session 3. Research Scopes	14
Chapter 2. International and Domestic Technology Status	15
Session 1. International and Domestic Status	15
Session 2. Problems	16
Session 3. Solutions for the Problems	17
Chapter 3. Methods and Results	18
Session 1. Overall design of the study	18
Session 2. Materials and Methods	21
Session 3. Results and discussions	40
Chapter 4. Achievement and Contribution to related fields	67
Session 1. Achievement	67
Session 2. Contribution to related fields	73
Session 3. Outcome of the study	74

Chapter 5. Application of Results 75

 Session 1. Necessity of additional research 75

 Session 2. Application to the other studies 76

 Session 3. Methods for manufacturing 77

Chapter 6. Information collected from overseas 78

Chapter 7. References 79

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	10
1 절. 연구개발의 목적	10
2 절. 연구개발의 필요성	10
1. 기술적 측면	11
2. 경제·산업적 측면	12
3. 사회·문화적 측면	13
3 절. 범위	14
제 2 장. 국내·외 기술개발 현황	15
1 절. 국내·외 현황	15
2 절. 문제점	16
3 절. 해결 방법	17
제 3 장. 연구개발의 내용 및 결과	18
1 절. 연구의 추진체계	18
1. 추진배경	18
2. 연차별 연구개발 목표와 내용	20
2 절. 연구개발의 수행내용	21

1. 표준화 연구	21
가. 산삼 특이유전자 발굴	21
나. ginsenoside 함량 분석	30
2. 효능 연구	33
가. 항산화 효능 비교연구	33
나. 항암효능 비교연구	36
3. 제품 개발 연구	37
가. 열처리를 이용한 연구	37
나. 발효를 이용한 연구	37
다. 산 및 효소를 이용한 연구	38
3 절. 연구개발의 수행결과	40
1. 표준화 연구결과	40
가. 산삼 특이유전자 발굴	40
나. ginsenosides 함량 분석	48
2. 효능 연구결과	50
가. 항산화 효능 비교연구	50
나. 항암효능 비교연구	51
3. 제품 개발 연구결과	54
가. 열처리 과정에서 각 시료의 ginsenosides 함량 변화 결과 ...	54
나. 발효과정에서 ginsenosides의 함량변화 결과	54
다. 산 및 효소를 이용한 연구결과	62
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야의 기여도	67
1 절. 목표달성도	67
2 절. 관련분야의 기여도	73

3 절. 연구 성과	74
제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획	75
1 절. 추가연구의 필요성	75
2 절. 타 연구에의 응용	76
3 절. 기업화 추진방향	77
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학정보	78
제 7 장. 참고문헌	79

제 1 장. 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 목적

- 산양산삼 품질의 표준화를 위한 유전적 감별법을 확립하고 이를 응용한 산양산삼 유전자 감별 기술을 개발함.
- 우수 유전자원 확보를 통한 산업화 준비
- 국제 경쟁력 있는 우수 산양산삼 자원의 재배 기술 개발
- 산양산삼의 홍삼화 및 발효 등의 가공 기술을 이용한 맞춤형 면역 기능 강화 제품 및 항암제 개발
- 개발 기술의 기술 이전을 통한 농촌 경제의 활성화에 기여

2 절. 연구개발의 필요성

• 산양산삼이란?

山蔘은 五加科(두릅나무과 ; Araliaceae)에 속한 다년생 초목인 人蔘(*Panax ginseng* C. A. Mey.) 이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 蔘을 일컬으며¹⁾ 산양산삼은 산삼의 씨앗이나 어린 삼을 인위적으로 산에서 재배한 삼을 말함.

인삼은 전 세계에서 가장 많이 사용되고 있는 천연물 중의 하나로서 면역기능 강화나 암 예방 등에 도움을 줄 수 있는 천연물임²⁻³⁾ .

산삼은 거의 희소하여 산업적인 가치가 적으나 산양산삼은 현재의 대량재배 기술로 산업화가 가능함.

• 산양산삼의 효능

진한시대의 의서인 『神農本草經』에서 “補五臟，安精神，定魂魄，止驚悸，除邪氣，明目，開心，益智，久服輕身延年”⁴⁾라 하여 자양강장효과와 항 노화효과가 우수한 한약제로 알려져 있음.

• 분포

- 인삼의 자생지를 보면 한국을 비롯하여 중국의 만주, 소련, 일본, 미국 및 캐나다의 일부 지역에 한정되고 있음.
- *Panax* 속 식물이 생육할 수 있는 자연조건으로서 ① 냉습한 낙엽성 삼림 ② 분명한 겨울의

추위와 성장계절인 하계의 충분한 강우량이 필요한 식물임.

- 산삼의 산지는 북반구권이며 그 중에서도 온대권의 지대로 위도상으로 보면 북위 30~48도에 이르는 지역으로 제주도와 전라남도의 남부를 제외한 대한민국의 전역이 산삼이 자생할 수 있는 지역임.
- 외국으로는 만주의 북위 43~47도, 동경 117~143도의 장백산 일대와 흑룡강 일대의 밀림지대, 그리고, 길림성 일대와 러시아 지방의 북위 43~48도까지의 연해주 하바로스크 남북지방 등이 해당됨
- 인삼은 대한민국의 대표적 약용작물이나 홍삼을 제외한 대부분의 제품들이 세계시장에서 고전하고 있음(홍콩 인삼시장 점유율 2.9%)⁵⁾. 산양산삼은 인삼보다 더욱 뛰어난 항산화, 항암, 면역 강화기능을 가지고 있어 이에 대한 연구가 필요한 실정임.
- 이에 본 연구진은 유전적 감별법을 이용한 산양산삼의 품질관리 시스템을 구축하고 산양산삼 기반의 면역기능강화, 혹은 항암보조제를 개발하여 향후 대한민국을 상징할 수 있는 *Panax ginseng* 제품으로 인삼이 직면한 수출장벽을 쉽게 극복하고, 우수한 효능을 지닌 고부가가치 제품으로 개발되어 국위선양에 이바지하고자 하는 것이 본 연구의 의도임.

1. 기술적 측면

가. 유전적 감별법을 이용한 산양산삼의 품질관리 시스템 구축

Suppressive Subtraction Hybridization (SSH) 방법을 이용하여 산양산삼에서만 특이적으로 발현하는 바이오마커 유전자를 발굴하여 확보하고 이의 분자유전학적 정체성을 규명하고 이를 올리고 뉴클레오타이드 어레이 방식을 이용하여 산양산삼 감별용 DNA 분석 기술을 개발하며 이를 이용하여 우수 유전자를 가진 산양산삼 종자의 검색과 산업화를 위한 유전자원 확보하고자 하였음.

나. 산양산삼 기반의 제품개발 기술 확보

인삼에 함유된 비극성 사포닌인 ginsenoside-Rg₃와 ginsenoside-Rh₂ 그리고 compound K 등은 항암작용 및 항 전이작용⁶⁻⁸⁾ 이 우수한 성분으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 우수한 품질의 산양산삼을 원료로 하여 ginsenoside-Rg₃와 ginsenoside-Rh₂ 그리고 compound K 등의 함량을 기존의 홍삼이나 특정 제품보다 높여 전 세계적으로 경쟁력을 지닐 수 있는 면역 강화제 혹은 항암보조제를 개발할 수 있는 기술을 확보하고자 하였다.

다. 우수 유전자원의 확보

유전자 분석을 통하여 확인된 우수 유전자원을 확보하고 이를 대량 재배할 수 있는 기술을 개발하여 향후 농가의 소득 증대 품목을 형성하고자 하였다.

2. 경제·산업적인 측면

가. 인삼은 한국을 대표하는 특산물로 고려시대 때부터 한국의 상징적 제품임.

나. 국내 한약재 관련 시장은 2005년 1조 5,000억 규모이며 이중 약 6,000-8,000억 원 규모가 홍삼 시장임⁵⁾. 이미 홍삼은 대한민국의 대표적인 건강기능식품으로 정착하였고, 국외에서도 한국 홍삼의 높은 품질을 인정받고 있음.

다. 하지만 세계최대의 인삼집결지인 홍콩 시장에서 한국인삼의 시장점유율은 1998년을 기준으로 전체의 1.4%에 불과하고 매출액 대비면에서는 11.8%를 차지하는 등 전반적인 하락세를 나타내고 있음

라. 이에 반해 미국과 캐나다에서 생산되는 화기삼(*Panax quinqueforium*)은 1990년대 후반부터 금액이나 물량 면에서 전체의 약 70% 이상을 차지하고 있음.

마. 이러한 이유는 가공 기술과 제품 개발, 마케팅 전략 등 복합적인 요소가 있으나 토질의 노령화로 인한 비료의 사용과 이로 인한 인삼의 잔류농약, 중금속 함량의 수출 기준 초과, 그리고 화기삼과 경쟁하여 고려인삼의 위상을 제고할만한 고부가가치의 신제품 개발이 필요함.

바. 중국에서는 이미 1980년대에 인삼에 산 처리기법을 이용한 ginsenoside Rg3와 Rh2 생성기술로 이미 Shenyi Jiaonang(Rg3) 및 GOOD LIFE(Rh2) 제품을 개발하여 시판 중에 있으나 이러한 제품들은 S-type(Natural type)이 아닌 R-type의 ginsenoside로 효능에 의문이 제기되고 있고, 판매 실적 또한 우수한 수준에 미치지 못하는 것으로 알려져 있음.

사. 글로벌 제약회사인 ‘베링겔 잉겔하임’에서 생산되는 인삼으로 만든 건강보조식품인 “Ginsana”의 경우 한해에 약 30억 \$의 매출을 이루고 있음. 이는 한국의 홍삼 전체 매출의 약 5배에 해당되는 규모로 이미 전 세계의 인삼시장 규모는 매우 크게 형성되어 있음.

아. 또한 전 세계의 건강보조식품 시장은 고령화와 성인병의 증가 등으로 1997년에 650억 \$의 시장 규모가 2,000년에는 1380억 \$, 그리고 2007년에는 1조 \$ 이상으로 성장하는 등 빠르게 변화하고 있음.

자. 자연산 산삼과 거의 유사한 효능을 나타내며 농약이나 중금속 오염에 대한 우려가 없는 친환경 제품인 산양산삼을 이용하여 성인병 등에 유용한 제품을 개발하면 한국 농산업의 새로운 수입원을 개척하고 전 세계 건강보조식품 시장에서 한국의 브랜드로 경쟁하여 상당한 외화획득이 가능함.

차. 이는 한국 농촌의 숙원사업인 고부가가치 상품의 생산과 현재 한국의 인삼이 가지고 있는 다양한 문제(잔류 농약, 중금속 오염 등)를 해결하기 위한 대안이 될 수 있음.

카. 본 과제에서는 유전자 분석을 통하여 확인된 우수 유전자원을 대량 재배하여 우수한 산양

산삼원료를 이용한 면역 강화제품 및 항암보조제를 생산할 수 있는 원천기술을 확보하고 제품의 양산체제를 구축하여 향후 국내·외의 시장 개척이 가능할 수 있도록 연구를 진행하고자 하였음.

3. 사회·문화적 측면

- 가. 현재 국내에는 약 2,200여 농가 및 조합에서 산양삼을 재배하고 있으나 판로 확보에 심각한 어려움을 겪고 있고, 또한 중국이나 캐나다 등에서 가짜 산삼이 진짜 산삼으로 둔갑하여 유통되는 등 사회적으로 많은 문제를 야기하고 있음.
- 나. 한국의 지형은 산양산삼을 재배하기에 최적의 환경을 지니고 있어 농촌에 약간의 교육과 지원만 이루어지면 어렵지 않게 많은 농가에서 고부가가치 상품을 생산할 수 있음.
- 다. 인삼의 종주국으로 한국을 대표하는 브랜드 중의 하나가 인삼이지만 아직까지 인삼과 산양산삼, 그리고 자연산 산삼을 감별할 수 있는 기술이 확보되어 있지 않음.
- 라. 이로 인하여 산에서 재배한 인삼이 산양산삼이나 자연산 산삼으로 판매되거나, 혹은 산양산삼이나 화기삼이 자연산 산삼으로 판매되는 등 현재 매우 혼란한 유통구조를 가지고 있으며, 이러한 상황은 우수 국가자원의 발전을 심각하게 저해하는 문제임.
- 마. 따라서 우수한 효능을 지닌 산양산삼이나 자연산 산삼을 대량 재배하여 국가 경쟁력을 향상시키기 위해서는 이에 대한 관리 감독을 쉽게 할 수 있는 진단기술이 필수적임.
- 바. 본 연구에서는 산양산삼의 특이활성 유전자를 쉽게 검색할 수 있는 기술(Substation hybridization)을 확보하여 이러한 문제를 근본적으로 해결하고자 함.
- 사. 또한 우수 유전자를 가지고 있는 종자의 확보와 이를 대량 생산할 수 있는 전진기지를 전문 재배 농가에 설치하여 향후 산업화에 필요한 공급원으로 삼고자 함
- 아. 산양산삼을 재배하는 농가가 가장 필요로 하는 기술인 제형 변화를 통한 제품 개발을 수행하여 안정적인 수입원이 발생할 수 있도록 하고자 함.
- 자. 과학적 연구를 바탕으로 재현성과 객관성을 확보한 다양한 산양산삼 제품 개발 기술을 확보하여 국내·외의 시장을 개척하고자 하는 농가나 제약회사를 중심으로 기술이전을 시행하여 새로운 산양산삼 수요 시장을 형성하고자 함.
- 차. 또한 향후 진행될 북한과의 경제 협력 과정에서 넓은 산림과 풍부한 노동력을 지닌 북한에 대규모 재배단지를 구축하여 한민족이 더불어 잘 살 수 있는, 한국의 대표 상징 제품을 남북이 공동 생산 개발하기에 가장 적절한 상품으로 추정됨.
- 카. 현재 사망률 1위를 기록하고 있는 암의 치료에 부작용이 없으면서 면역력을 강화하고 암의 전이를 억제하는 산양산삼 제품을 개발하여 국민 보건에 기여할 수 있음.

3 절. 범위

1. 산양산삼 가공제품개발 및 효능평가

- 산양산삼의 유전적 감별기술 개발을 통하여 충분한 표준 시료(산삼)를 획득 후 이들의 유전자 발현에서 인삼과 차이를 나타내는 특이 유전자를 분석해 낸 후 산삼의 특성을 나타내는 유전자원을 규명하고자 하였음.
- 산양산삼의 제품개발을 위하여 제형 개발을 위한 원료를 확보한 후 선행연구 결과를 통하여 산양산삼의 효능을 극대화시키기 위하여 온도, 압력에 따른 홍삼화 과정과 유산균을 이용한 발효 공정을 다양하게 접목하여 시제품을 개발한 후 각각의 시제품에 대한 수종의 ginsenosides 함량을 추적하여 가장 우수한 환경을 찾고자 추적하고 있음.
- 이를 통하여 향후 본 연구의 핵심기술인 제품개발이 이루어질 것으로 예측하고 있음.

2. 산양산삼의 유전적 감별기술 개발

- 인삼과 산양산삼 그리고 자연산산삼의 객관적인 감별 기술을 개발하기 위하여 약 200여 샘플에 대한 유전자원을 확보한 후 SSH(Suppressive Subtraction Hybridization) 방법에 의하여 인삼과 구별되는 특이 유전자를 추적한 결과 산삼에만 존재하는 특이 유전자인 pNRT2 와 pGAPDH-w, rpoC1, 그리고 psbB 등의 신규 유전자를 확보하였음.

3. 산양산삼 가공제품의 분석 및 평가방법 개발

- 산삼의 특이 유전자인 pNRT2와 pGAPDH-w, rpoC1, 그리고 psbB의 신규 유전자를 지낸 종자를 확보하였고, 현재 우수 유전자원을 지낸 종자를 받아하여 재배 환경을 확보하고 대량생산체제를 구축하였음.
- 또한 생육 환경에 의한 유전자 활성의 변화를 관찰하여 가장 산삼의 활성을 극대화할 수 있는 재배 기술이 무엇인가를 추적 중임.

제 2 장. 국내·외 기술개발 현황

1 절. 국내·외 현황

1. 국내 연구 현황

- 가. 현재 국내의 우수 기업이나 대학 등에서 인삼 혹은 배양근과 관련한 연구는 활발히 이루어지고 있으나 산양삼 혹은 산양산삼과 관련한 연구는 본 연구진 외에 전무한 실정임.
- 나. 본 연구진은 이미 10 년 전부터 산양산삼에 대한 효능평가와 기전 연구 및 의약품 개발을 위한 연구를 진행하고 있음.
- 다. 최근 관리 및 생산의 편의성 등을 위해 산삼 배양근이 개발되었으나 효능이나 문제점 등은 거의 연구되고 있지 않음.
- 라. 홍삼에 대한 우수한 효능을 입증하는 임상 연구가 1990년대부터 국내·외적으로 다양하게 이루어지고 있고, 이러한 연구를 통해 한국의 홍삼이 세계적인 제품으로 점차 인정을 받고 있음.

2. 국외 연구 현황

- 가. 외국에서도 야생 삼에 대한 연구나 이를 이용한 면역기능 강화제품 등의 개발 연구는 전무한 실정임.
- 나. 현재 국내에서는 인삼과 이를 이용한 제품 개발에 대한 연구는 활발하게 이루어지고 있으나 산양삼이나 산양산삼에 대한 연구는 거의 전무함.

2 절. 문제점

1. 국내 제품생산 및 시장 현황⁵⁾

- 가. 국내인삼 제품의 생산은 2005년도 일차 산지 재배 인삼생산 총액이 약 5천 8백억원, 2차 가공 처리된 인삼제품(인삼엑스, 분말, 캡슐, 각종 홍삼 류 등)의 출하량이 2천3백억 정도였음.
- 나. 따라서 일차 재배 인삼이 2차 제품으로 재생산 되는 것과 수출 등을 감안할 때 약 5천에서 6천억 정도의 국내 인삼 소비시장이 형성되어 있다고 추정됨.
- 다. 2006년 현재 전 세계 인삼 시장은 약 200억불정도로 성장하였으며, 이중 한국의 수출물량은 약 8천 9백만 불에 머물고 있음.
- 라. 향후 한국 인삼 류의 해외시장 경쟁력 확보의 차원에서 점차 고부가 가치를 만들 수 있는 전략적 상품의 개발이 시급함.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 가. 세계적으로 인삼을 주로 소비하는 지역은 한국, 일본, 중국 등 동남아시아권의 나라들이나 건강기능성 식품이 각광을 받으면서 전 세계적으로 인삼에 대한 수요가 증가하는 추세임.
- 나. 홍콩은 전 세계 인삼 거래량의 70%가 유통되고 있으며, 2005년 기준으로 뿌리 삼 1억불, 인삼 가공 제품 류 2억불의 수입시장을 형성하고 있음. 이중 한국에서 수입되는 물량은 약 3% 정도임.
- 다. 중국은 2000년 기준으로 전 세계 인삼 생산량의 70%(52,000톤)를 생산하고 있으며, 이중 80%이상이 길림성 일대에서 재배됨. 최근 길림성 인삼의 브랜드화를 추진하면서 품질향상에 전력을 기울이고 있어 한국 인삼의 전략적 대응이 필요함.
- 라. 일본의 경우 인삼을 대부분 한국, 중국 등지에서 수입하고 있으며, 한국인삼 수출의 대략 30%(2005년 기준, 3000만 달러) 정도를 차지하고 있음. 일본은 뿌리 삼 형태로의 유통은 거의 없고 제약회사나 건강 기능식품의 완제품 형태로 판매되는 것이 특징임. 다양한 제형의 개발은 일본시장 확대의 주요 고려 사항이 될 수 있음.
- 마. 미국의 천연물 제품의 매출은 2004년 약 52억불에 달하였으며, 이중 인삼제품의 수입액은 2005년 기준 약 745만 달러이고, 이중 한국 제품의 수입시장 점유율은 28.7%로 중국 다음으로 많으며 매년 점차 증가 추세에 있음.
- 바. 미국 시장의 소비 패턴은 캡슐이나, 타블렛, 스낵, 드링크 류 등 다양한 형태의 제형을 선호하는 경향이 강하고, 객관적인 인삼효능 데이터를 요구하므로 이에 대비하여 다양한 제형 개발 및 인삼 제품 류의 표준화된 품질관리 시스템이 요구되고 있음.

3 절. 해결 방법

- 가. 현재 한국의 인삼이 외국으로 수출되는데 가장 큰 장벽인 잔류 농약이나 중금속의 함량을 현저히 낮추는 개선이 필요함.
- 나. 한국의 인삼이 우수한 효능을 가지고 있음을 학문적으로 입증하고 이를 홍보하여야 함.
- 다. 철저한 품질관리를 통해 한국의 삼은 믿을 수 있다는 확신을 세계에 주어야 함.
- 라. 끊임없는 노력을 통해 삼의 품질향상에 만전을 기해야 함.
- 마. 우수한 품질의 삼을 원료로 효능을 증대시킬 수 있는 제품 개발기술을 확보해야 함.
- 바. 베링겔 잉겔하임의 “Ginsana”의 사례에서 알 수 있듯이 세계인의 소비 패턴을 잘 파악하여 캡슐이나, 타블렛, 스낵, 드링크 류 등 다양한 형태의 제형을 개발하고, 객관적인 성분 분석이나 함량의 인정노력이 이루어져야 함.

제 3 장. 연구개발의 내용 및 결과

1 절. 연구의 추진체계

1. 추진배경

- 가. 대한민국은 국토의 약 67%가 임야이며 북위 36-43°에 위치한 산삼재배의 최적지에 해당됨.
- 나. 예로부터 한국의 인삼을 최상품으로 인정할 정도로 삼의 품질이나 재배기술이 발달되어 있음.
- 다. 산삼은 우수한 효능이 있다고 알려져 있으나 희소성과 높은 가격으로 인해 대중화에 적합하지 않음.
- 라. 최근 고수익산업으로 산양삼 재배농가가 기하급수적으로 늘고 있으나 대부분이 인삼의 씨앗을 산에서 키우는 형태임.
- 마. 국제시장에서 한국의 인삼은 가격의 경쟁력이나 품질 등에서 좋은 평가를 받지 못하고 있으며 그 결과로 홍삼제품을 제외하고는 국가적인 경쟁력이 떨어지는 현실임.
- 바. 대한민국을 대표할 수 있는 약용식물로 우수한 유전자원을 지닌 산양산삼 품종을 유전자 진단법을 통해 정확히 진단하고, 또한 대량 확보하여 재배할 수 있는 기술과 능력을 본 연구진은 가지고 있음.
- 사. 또한 다년간의 연구를 통해 인체 내에서 흡수가 용이하고, 활성 작용이 강한 특정 ginsenoside 성분을 강화하는 기술을 개발하여야 국제적인 경쟁력을 확보할 수 있음.
- 아. 상기한 연구과정을 통해 산양산삼을 이용하여 ginsenoside-Rg₃와 ginsenoside-Rh₂ 및 compound K 등의 함량을 높여 항암 효능과 면역기능 활성효과를 지닌 제품을 개발하고자 함.

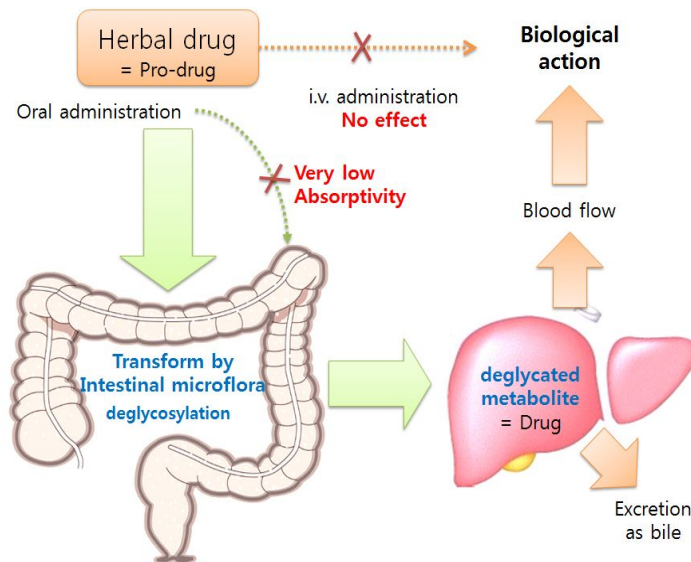


그림 1. 인삼이 가지고 있는 많은 ginsenoside는 장 내에 존재하는 미생물의 분해과정을 통해 인체에서 흡수되는데 장내 미생물이 부족한 경우에는 대부분의 성분들이 인체에서 흡수되지 않고 배설되게 됨. 따라서 본 연구진에서는 인체에 흡수가 용이한 형태로 ginsenoside를 형질 전환하는 연구를 수행하고 있고, 특히 항암 및 면역 활성화작용이 강한 ginsenoside Rd, Rg3, Rh2 및 Compound K 등을 다량 함유한 산양산삼 제품을 개발하고자 하였다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	2008	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산양산삼, 인삼, 자연산 산삼의 분석 시료 확보 ○ 자료 수집 ○ 적절한 홍삼 제형 개발을 위한 환경 탐색 ○ 효능 평가 실험 디자인 확보 ○ 우수유전자 마커를 지닌 종자 확보를 위한 평가 ○ 산양산삼에서 마커 유전자의 선발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구에 사용될 샘플의 확보 및 이를 이용한 분석 환경 검색 ○ 온도와 압력, 시간 변수에 따른 산양산삼의 변화과정 추적 ○ 가장 효능이 뛰어나고 상품성이 우수한 조건의 추적 ○ 적절한 효능의 평가를 위한 수종의 방법을 이용한 향산화, 폐암 세포주에 대한 항암 효능 평가 모델 설정 ○ 산양산삼으로부터 SSH 방법을 이용한 유전자 D/B 확보 	자료와 샘플 수집 및 실험연구
2차년도	2009	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산양산삼의 마커 유전자 유전정보 분석 및 확인 ○ 우수 유전자원의 평가 ○ PCR-RAPD 방법을 적용한 시료 분석 ○ 시험용 고온·고압기 제작 ○ 원적외선 건조기 제작 ○ 건조 산양산삼의 적정 발효 환경 탐색 ○ 개발된 제형들에 대한 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마커유전자의 염기배열 분석 및 유전적 정체성 확인 ○ 수종의 샘플 중 우수 유전자원 확보 ○ PCR-RAPD를 이용한 재분석 결과와 SSH의 비교 ○ 복사에너지를 열원으로 하는 Glass bulb와 T3 quartz lamp를 이용한 건조기 제작 ○ 연구용에 적합한 소규모의 고온·고압 자동조절기 개발 ○ 다양한 환경에 의해 개발된 산양산삼 가공 제품들에 대한 효능 평가 	실험연구 기술개발 제품가공기술 개발 기자재 개발
3차년도	2010	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 산양산삼의 품질관리 시스템 구축 ○ 우수 유전자원의 확보 ○ 우수 종자의 재배를 통한 종묘 확보 ○ 산양산삼의 마커유전자 활용기술개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전적 감별용 DNA chip 기술을 개발 ○ 산양산삼의 가공 기술 확보 ○ 용도별 제품 개발 ○ 산업화 기술 확보 ○ 표준화 기술 확보 	실험연구 기술개발 제품가공기술 개발 기자재 개발 제품개발 우수 유전자원의 확보

2 절. 연구개발의 수행내용

1. 표준화 연구

가. 산삼 특이유전자 발굴

(1) 수종의 인삼, 산양산삼, 자연산 산삼의 시료 확보

현재 국내에서 재배 중인 인삼과 산양산삼 시료와 백두산 및 국내에서 채취된 자연산 산삼 등 다양한 삼 시료와 종자를 최대한 다양하게 많은 양을 확보하였다.



그림 2. 분석에 사용된 국내 인삼과 삼칠근 및 서양삼



그림 3. 분석에 사용된 국내 산양삼



그림 4-1. 분석에 사용된 국내 및 백두산 산삼



그림 4-2 분석에 사용된 국내 및 백두산 산삼



그림 4-3 분석에 사용된 국내 및 백두산 산삼

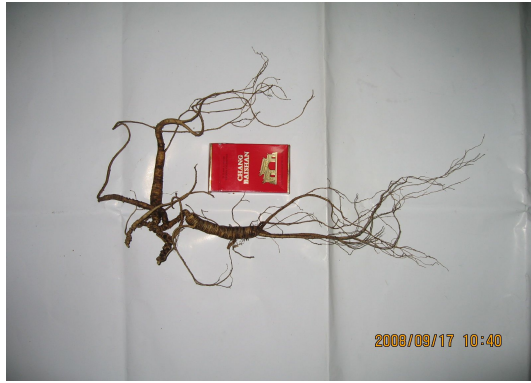


그림 4-4 분석에 사용된 국내 및 백두산 산삼

(2) Suppressive Subtraction Hybridization (SSH)에 의한 산양산삼 마커 유전자의 탐색

(가) SSH 방법을 통하여 산양산삼에서만 특이적으로 발현하는 바이오마커 유전자의 분리 동정

① RNA extraction and PCR-based Subtraction:

- Total Cellular RNA(Qiagen, Hilden, Germany)를 분리하고, Promega의 PolyAtract mRNA Isolation Kit로 mRNA를 분리다. PCR-select cDNA Subtraction Kit (Clontech, USA)의 Primer를 사용해서 cDNA를 합성하고 Control과 산양산삼으로부터 이중나선의 cDNA를 Rsa I으로 제한절단하였다. Adaptor 1과 Adaptor 2R을 5'-terminal, 3'-terminal에 연결하고 2차례의 Hybridization에 의해 Subtraction하였다. Subtraction된 cDNA 혼합액으로부터 과량 발현된 cDNA를 PCR로 증폭하였다.

② 유전자의 클로닝

- TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)을 사용하여 pCR 2.1 Vector에 PCR Product를 Cloning하였다.
- 얻어진 클론으로부터 DNA를 추출하여 염기서열 분석하고 Genebank에서 염기서열 유사성 분석을 통하여 유전자를 확인하였다.
- PCR 은 Perkin-Elmer thermal Cycler (GeneAmp PCR system)을 사용하고 온도조건은 다음과 같은 조건으로 30회 반복하였다.

94°C 30 sec -> 56°C 30 sec -> 72°C 1min

(나) 산양산삼의 마커 유전자 유전정보 분석 및 확인

① cDNA 라이브러리 합성:

- Total Cellular RNA(Qiagen, Hilden, Germany)를 분리하고, Promega의 PolyAtract mRNA Isolation Kit로 mRNA를 분리하였다.
- 분리된 RNA는 Spectrophotometer를 사용하여 RNA mode (260과 280 nm)에서 정량.
- 역전자(reverse transcription) 반응을 수행하기 위해 흡광도에 근거하여 2µg 의 total RNA 와 oligo (dT)12-18 primer (100pmole/µl)를 함께 70°C에서 10분간 가열한 후, 얼음에서 냉각시킨다. 여기에서 1st strand buffer (50mM tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, 500µM dNTP, 20 unit RNase Inhibitor 그리고 200unit 의 M-MLV reverse Transcriptase 를 첨가한 후 37°C에서 60분간 반응시키고, 70°C에서 15분간 가열하여 역전사효소를 불활성화 시킴.

② RT-PCR를 통한 발굴된 후보 유전자의 검증:

- 후보유전자의 full-length cDNA를 주형으로 통상적인 PCR 방법에 의해 증폭함.
- PCR은 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 100 µg/ml 젤라틴, 0.2 mM dNTPs, 1.25 단위 Taq 중합효소(Perkin-Elmer) 및 50 pmol primer를 포함하는 50 µl 반응

용액에서 수행함.

- PCR 조건은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분의 반응을 35회 반복 수행.
- 전기영동을 통해 후보 유전자들의 산양산삼의 마커 유전자임을 검증함.

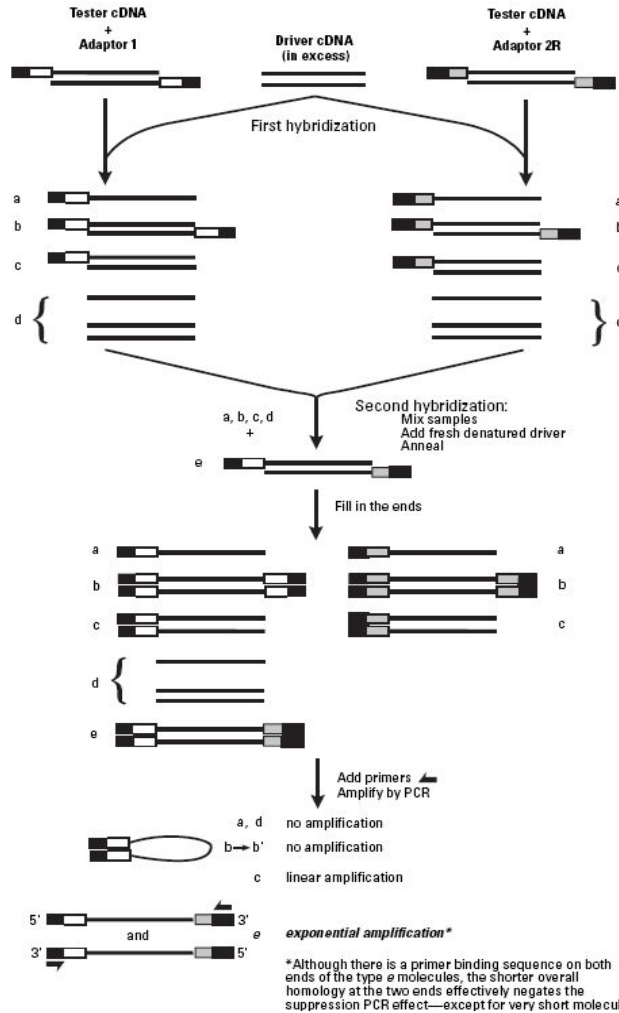


그림 2. Suppressive Subtraction Hybridization (SSH)방법

(3) PCR-RAPD를 이용한 한국산 산양산삼과 중국산 산양산삼의 특이 유전자 감별방법 개발

(가) 수종의 삼류에 대한 DNA 추출

- 인삼과 한국산 및 중국산 산양산삼과 자연산 산삼의 유전자 발현 특징을 규명하기 위하여 1.0% agarose gel에 채취된 10 µl의 DNA를 넣고 전기 영동하여 DNA의 질을 평가함 (그림 3).

(나) PCR을 이용하여 수종의 삼류에서 추출된 DNA의 증폭

- 수종의 삼류에 대한 유전자 발현의 차이를 확인하기 위하여 심 등에 의해 고안된 SIMSP primer (Forward: 5'-AGGGGTCTTGCTATAGCGG. AAC-3', Reverse: 5'-AGTCTTAATTTTCATATTTTCGTATG-3')와 SIMGS primer (Forward: 5'-CTATAGCGGAACACGAGGGA-3', Reverse: 5'-AGTTCGCCACCAACTGTAGC-3') 그리고 SIM2 primer (Forward:5'-CTATAGCG GAACACGAGGGA-3'Reverse: 5'-ATACCAAGCGCTCGCTAATG-3')를 사용하여 PCR을 수행함.
- SIMSP primer는 359 bp(base pairs), SIMGS primer는 210 bp, 그리고 SIM2 primer는 290 bp(Fig. 10-2)를 나타내게 된다.

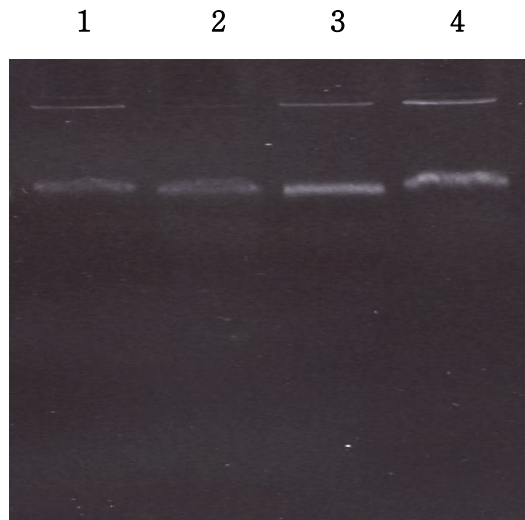


그림 3. Identification of the genomic DNA of ginseng.

- 1, Chinse ginseng, 3 years; 2, Chinse ginseng, 5 years; 3, Panax ginseng; 4, Cultivated-wild ginseng.

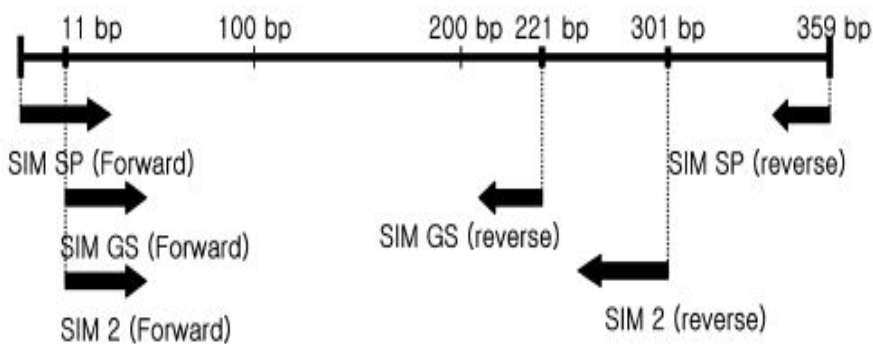


그림 4. The marker primer of chloroplast DNA in Panax ginseng.

(다) RAPD를 이용하여 수종의 삼에 대한 감별 기준이 되는 발현 유전자의 확보

- PCR-RAPD(Randomly-Amplified polymorphic DNA)가 지닌 빠른 시간 내에 결과를 평가하고, 저비용, 고효율의 장점을 살려 인삼과 산양산삼, 자연산 산삼 및 중국산 산양

산삼의 감별 기준이 되는 발현 유전자를 검색하여 산양산삼의 품질 표준화에 본 기술을 적용하고자 하였다. 본 기술에 사용될 primer는 윤 등에 의해 개발된 것(2003)으로 primer-3 (5'-GTGTGCGATCAGTTGCTGGG-3'), primer-6 (5'-ATGTGTGCGATCAGTTGCTG-3'), 그리고 primer-9 (5'-AATGTGTGGCAAGC TGGTGG-3') 등을 53에서 54 °C의 환경에서 적용하여 그 산물을 1,000-1,500 bp에서 비교 평가하고자 하였다.

나. Ginsenoside 함량 분석

(1) HPLC를 이용한 산삼, 산양삼 그리고 인삼의 성분분석

(가) 실험기기 및 시약

- Rotary vacuum evaporator는 Eyela (Tokyo Co.)의 농축기를 사용하였고, 분석용 HPLC로는 Varian 9012 Solvent Delivery System, 검출기는 Varian Variable Wavelength 9050 UV-VIS detector, 그리고 Autosampler는 Varian 9300을 사용하였다. AcCN, MeOH 등의 분석시약은 모두 HPLC용 시약을 사용하여 측정하였으며, 추출 및 분획용 용매는 모두 특급시약을 사용하여 실험하였다.

(나) 추출 및 분석 시료

- 음건한 삼류(1-20 g)에 80% MeOH 100-500 ml를 가하여 수욕 상에서 3시간씩 3회 환류 추출하고 여과 후 농축하여 80% MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 80% MeOH 추출물을 증류수에 현탁시켜 *n*-hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH 순으로 분획한 후 농축하여 사포닌 주성분 분획물인 *n*-BuOH 분획물을 얻었다. 조사포닌 *n*-BuOH 분획물을 사포닌의 패턴 분석을 위한 시료로 사용하였다(그림5).

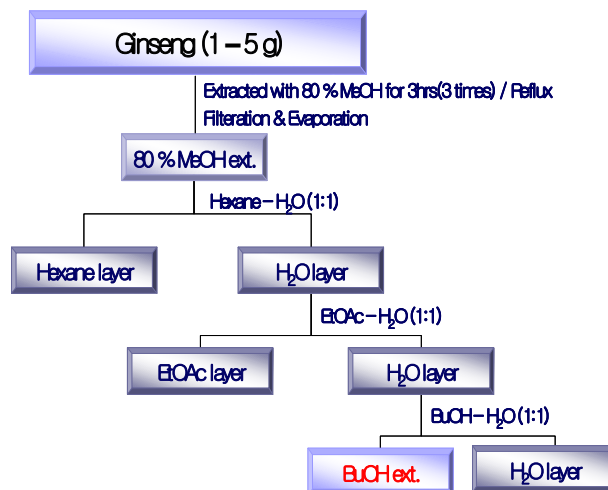


그림 5. Manufacturing process of crude saponin by extraction and fraction

(다) HPLC의 분석조건

- HPLC 조건은 column은 Capcell Pak C₁₈(150×4.6mm, 5μm, Shiseido Co.)이며 유속은 1 ml/min, column 온도는 40℃, 시료 주입량은 20 μl로 UV 203 nm에서 실험하였다. 분석시의 이동상 조건은 Table 1.에 나타내었다.

Table 1. HPLC condition for analysis of ginsenosides

Instrument				
Pump	9012 Solvent Delivery System, Varian Co.			
Detector	9050 Variable Wavelength UV-VIS Detector, Varian Co.			
Autosampler	9300 Autosampler, Varian Co.			
Column	Capcell Pak C ₁₈ (150 × 4.6mm: 5μ), Shiseido Co.			
Operating condition				
UV Absorbance	203 nm			
Column temp.	40℃			
Injection vol.	20μl			
Mobile phase A	Water			
Mobile phase B	Acetonitrile			
Gradient profile	Time(min)	%A	%B	Flow(ml/min)
	0:00	82	18	1.0
	25:00	78	22	1.0
	55:00	70	30	1.0
	75:00	60	40	1.0
	90:00	50	50	1.0

(라) 표준액 및 검액의 제조

- 비극성 사포닌류의 패턴 분석을 위한 표준액은 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₃, Rh₁ 그리고 Rh₂의 10종 표준품을 각각 100 μg/ml씩 취한 후 MeOH 1 ml에 녹인 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였고, 검액은 얻어진 시료 외에 *n*-BuOH 분획물 10 mg을 취한 후 MeOH 1 ml에 녹인 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 분석하였다.

(마) 검량선의 작성

- 표준품 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₃, Rh₁ 그리고 Rh₂의 10종 표준품을 각각 500, 400, 300, 200, 100, 50 μg/ml 농도로 희석하여 분석하여 얻은 각각의 ginsenoside에 대한 피크 면적비 (X축)와 표준품 농도 (Y축)에 대한 검량선을 각각 작성하였다. 그 결과 각 ginsenoside 류의 검량선의 함수와 상관계수 R²값은 Table

2.에 제시하였고 수율은 Table 3.과 같았다.

Table 2. Equation and R² value of ginsenosides

Sample	Equation	R ²
Ginsenoside Rb ₁	$y = 2211.5x - 848.88$	0.9998
Ginsenoside Rb ₂	$y = 1230.2x + 3108.7$	0.9996
Ginsenoside Rc	$y = 2318.7x - 4200.7$	0.9996
Ginsenoside Rd	$y = 2480.0x - 1937.1$	0.9996
Ginsenoside Re	$y = 2233.5x - 3970.4$	0.9992
Ginsenoside Rf	$y = 2800.5x - 3853.2$	0.9998
Ginsenoside Rg ₁	$y = 2666.8x - 1945.9$	0.9995
Ginsenoside Rg ₃	$y = 2618.3x + 845.58$	0.9997
Ginsenoside Rh ₁	$y = 2450.7x - 5594.0$	0.9997
Ginsenoside Rh ₂	$y = 1826.9x - 31205$	0.9929

Table 3. Yield of 80 % MeOH extraction and n-BuOH fraction on various ginsengs

Sample	80% MeOH extract(%)	n-BuOH fraction(%)
1. Wild Ginseng	9.03	2.65
2. Cultivated wild ginseng	6.66	1.20
3. Cultivated Ginseng 4 years	15.62	2.07
4. Cultivated Ginseng 6 years	20.71	0.73
5. Cultivated wild red ginseng	53.70	4.16
6. Cultivated Ginseng 4 years	19.06	2.34
7. Cultivated Ginseng 6 years	20.92	1.56

(바) 10종 표준품의 HPLC chromatogram과 분석시료의 chromatogram 양상

- 상기에서 제시한 방법에 따라 HPLC로 분석하여 표준품 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₃, Rh₁ 그리고 Rh₂와 수종의 삼류에 대한 각각의 chromatogram을 얻은 후 정량 평가하였다. 정량 평가에서 얻어진 값 중 최고와 최저치를 제외한 5개의 샘플의 평균을 구한 후 비교 분석하였다.

2. 효능연구

가. 항산화 효능 비교연구

그동안 보고된 인삼의 항산화와 관련한 연구로는 인삼을 복용하였을 때 항산화능이 증가되고¹³⁾, 백삼보다는 홍삼이 우수하며¹⁴⁾, 부위에 따라 다양한 항산화능이 있음이¹⁵⁾ 보고된 바 있다. 이러한 연구 결과는 재배되어진 인삼을 재료로 한 결과이며 아직까지 감별의 어려움과 희귀성 등의 이유로 산삼이나 산양삼에 대한 연구는 미흡한 실정이었다. 이에 자연산 산삼(이하 산삼)과 산양삼, 그리고 인삼의 항산화 효능을 비교·평가하고자 총 항산화능을 측정할 수 있는 Total antioxidant capacity(TAC), Oxygen radical absorbance capacity(ORAC)와 항산화 측정에 사용되는 Total phenolic content, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거 활성, 지질과산화 그리고 Reactive oxygen species (ROS) 등을 측정하고자 하였다.

(1) Total antioxidant capacity (TAC) 측정

- Total antioxidant status(총 항산화능)는 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) 방법¹⁷⁾을 수정한 Erel¹⁸⁾의 방법에 따라 TAC를 측정하였다. 산성 pH에서 무색의 환원형 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate, 이하 ABTS)는 H₂O₂에 의해 청록색의 ABTS⁺로 산화되게 된다. 만일 추출물 내 항산화물질이 존재하게 되면 이들 농도에 비례하여 ABTS⁺는 탈색되며, 이러한 색 변화반응의 결과를 660 nm에서의 흡광도로 조사하였다.
- 시료 추출물의 TAC 측정을 위해 0, 2.25, 4.5, 9.0, 22.5, 33.75 및 45 n-mol의 Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다. Trolox는 총 항산화능 측정에 광범위하게 사용되는 전형적인 표준시약으로 TAC 활성은 nmol Trolox equivalent로 표기하였다.

(2) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

- TEAC와 더불어 총 항산화능 측정에 널리 사용되고 있는 ORAC assay는 Huang 등¹⁹⁾의 방법에 따라 37°C에서 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 2분 간격으로 36분간 측정하였다. ORAC assay는 형광 표지물질에 대한 free radical의 손상 정도를 측정하는 일종의 inhibition method로써 형광물질로는 fluorescein을 사용하였으며, peroxy radical을 생성하는 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (이하 AAPH)를 사용하였다. 만일 추출물 내에 항산화물질이 존재하게 되면 이들 농도에 비례하여 free radical 손상이 억제되며 형광도의 감소가 억제되게 된다.
- 표준시약으로 0, 0.02, 0.2, 1 및 2 nmol의 gallic acid를 사용하였고, 표준시약과 추출물의 area under the curve (AUC)를 측정하였다. ORAC는 표준시약 농도와 AUC 간의 회귀곡선을 이용하여 nmol gallic acid equivalent로 표기하였다.

(3) Total phenolic content 측정

- 추출물 내 총 phenolic 함량은 gallic acid를 표준시약으로 사용하여 Sin-gleton과 Orthofer²⁰⁾의 방법에 따라 760 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 시료 추출물의 총 phenolic 함량 측정을 위해 0, 4.69, 9.38, 18.75, 37.5, 62.51 및 93.75 nmol의 gallic acid를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.
- Gallic acid는 총 phenolic 함량 측정에 가장 많이 사용되는 전형적인 표준시약으로 총 phenolic 함량은 nmol gallic acid equivalent로 표기하였다.

(4) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거활성 측정

- 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (이하 DPPH) free radical 소거활성은 Malterud 등²¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. DPPH 용액(45 µg/ml methanol)을 추출물과 혼합한 다음 515 nm에서 흡광도의 감소를 30초 간격으로 5분간 측정하였다.
- Free radical 소거활성은 pyrogallol 용액(125 µg/ml DMSO)의 흡광도 감소를 100%로 기준하여 표기하였다.

(5) 지질과산화 측정

- 추출물의 지질과산화 억제 효과는 간 미토콘드리아 배양액의 thiobarbituric acid reactive substances (이하 TBARS) 농도를 측정함으로써 결정하였다. 간 미토콘드리아 (0.5 mg/ml)를 10 µmol FeSO₄와 100 µmol ascorbic acid와 함께 추출물 농도별로 37°C에서 60분간 배양하였다. 미토콘드리아 배양액의 지질과산화는 Stacey와 Klaassen²²⁾의 방법에 따라 excitation 파장 530 nm와 emission 파장 590 nm에서 형광도를 측정함으로써 결정하였다.
- TBARS 농도 측정을 위해 0, 0.063, 0.127, 0.253, 0.506, 1.013 및 2.025 nmol의 1,1,3,3,-tetraethoxypropane을 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

(6) Reactive oxygen species (ROS) 측정

- 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 sodium hydroxide에 의해 DCFH로 탈아스테르화(deesterification)되며 DCFH는 ROS에 의해 형광물질인 dichlorofluorescein(DCF)으로 산화하게 된다. 본 연구에서는 1 µM H₂O₂와 10 µM FeSO₄를 사용하여 ROS를 생성하였다. 따라서 DCFH의 DCF 산화를 이용한 반응은 ROS, 특히 H₂O₂ radical 측정에 널리 이용되고 있다. DCF 형성에 따른 형광도 증가는 LeBel 등²³⁾의 방법에 따라 SPECTRAMax GEMINI XS Microplate Spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 형광도 감소는 추출물 내 항산화물질에 의한 ROS 생성 억제를 나타내게 된다. 실험방법을 간략히 기술하자면, 96-well plate에 100 µl의 40 mM Tris와 10 µl의 다양한 농도의 추출물 용액을 첨가한 뒤 50 µl의 DCFH 용액을 첨가하였다. DCFH 산화반응은 37°C에서 20 µl의 10 µM H₂O₂와 20 µl의 100 µM FeSO₄를 첨가함으로써 시작되며 (0 min),

excitation 파장 488 nm와 emission 파장 525 nm에서 2분 간격으로 10분 (10min) 동안 측정하였다.

(7) 단백질 정량

- 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준시약으로 사용하여 Lowry 등²⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다.

(8) Superoxide radical 소거활성 측정

- Superoxide radical 소거활성은 Liu의 방법²⁵⁾에 따라 측정하였다. 희석한 시료 20 μ l에 62 μ M nitro blue tetrazolium(NBT) 와 98 μ M β -nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)를 함유한 20 mM Tris 용액(pH 8.0) 800 μ l를 혼합한 다음, 20 mM Tris 용액 80 μ l와 33 μ M phenazine methosulfate(PMS) 100 μ l를 각각 첨가하였다. 즉, 비효소적으로 PMS/NADH로 유발된 superoxide radical은 NBT를 자주색의 formazan으로 환원시키며, 생성된 formazan을 측정하기 위해 560 nm에서 10분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였다. 시료의 슈퍼옥시드 라디칼 소거활성은 $[(\text{흡광도}_{\text{시료 무첨가}} - \text{흡광도}_{\text{시료}}) / \text{흡광도}_{\text{시료 무첨가}}] \times 100$ 의 공식으로 계산하였다.

(9) Hydroxyl radical 소거활성 측정 assay

- Hydroxyl radical 소거활성은 Halliwell 등의 방법²⁶⁾에 따라 측정하였다. 희석한 시료 50 μ l에 2.5 mM 2-deoxy-D-ribose를 함유한 10 mM PBS 용액 345 μ l를 혼합한 다음, 1 mM FeCl_3 와 1.04 mM EDTA 용액 50 μ l, 1 mM ascorbate 50 μ l 및 0.1M H_2O_2 5 μ l를 각각 첨가하였다. 37°C에서 10분간 배양한 후, 2.8% trichloroacetic acid 500 μ l와 1% 2-thiobarbituric acid 250 μ l를 첨가하고 95°C에서 8분간 가열하였다. 반응물을 냉각시킨후 532nm에서 흡광도를 측정하였으며, hydroxyl radical 소거활성은 $[(\text{흡광도}_{\text{시료 무첨가}} - \text{흡광도}_{\text{시료}}) / \text{흡광도}_{\text{시료 무첨가}}] \times 100$ 공식으로 계산하였다.

(10) 통계 분석

- 통계 프로그램은 SPSS Version 10.0(for Windows, U.S.A.)을 이용하였고, 농도별 추출물간의 항산화 효과는 일원분산분석을 사용하여 조사하였으며, 사후 분석으로 농도별 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test를 사용하여 $p < 0.05$ 에서 유의성을 조사하였다.

나. 항암효능 연구

(1) 대장암 세포주와 위암 세포주에서 AXCIN2 유전자의 발현 관찰

- 산양산삼의 항암효능 규명을 위한 유전자 분석을 시행하였다. 인간 대장암세포주인 LOVO 세포 및 인간 위암세포인 SNU601 세포에 산양산삼을 농도별로 처리한 후 암 세포의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있는 AXCIN2 유전자의 발현을 PCR을 통해 확인하였다.

(2) 대장암세포의 성장 억제효능

- CT-26 대장암세포를 생쥐의 복강에 주입하여 복강암을 유발한 후 암 종의 성장을 측정하여 그 변화를 관찰하였다.

3. 제품 개발 연구

- 항암작용 및 항 전이작용이 우수하다고 보고된 비극성 사포닌인 ginsenoside-Rg₃와 ginsenoside-Rh₂ 그리고 compound K 등은 삼류에만 분포하는 특이한 사포닌이다. 본 연구에서는 우수한 품질의 산양산삼을 원료로 하여 ginsenoside-Rg₃와 ginsenoside-Rh₂ 그리고 compound K 등의 함량을 높여 전 세계적으로 경쟁력을 지닐 수 있는 면역 강화제 혹은 항암보조제를 개발할 수 있는 기술을 확보하고자 홍삼화, 발효기법 그리고 산 처리 및 효소처리 방법 등을 사용하여 다양한 환경조건을 적용한 후 그 변화를 TLC와 HPLC를 이용하여 관찰하였다.

가. 홍삼화를 이용한 제품개발

(1) 열처리에 의한 ginsenoside의 함량 변화 관찰

- 인삼 및 산양삼이 홍삼으로 되는 과정에서 나타나는 ginsenoside의 함량 변화를 관찰하기 위하여 모든 시료를 흐르는 물에 깨끗이 세척한 후 고압 증숙기 안에 가지런히 세운 후 95-100°C에서 15시간 동안 증숙하였다. 증숙이 끝난 시료들은 다시 건조를 위해 95-100°C에서 72시간 동안 각각의 시료들이 타지 않도록 주의를 기울이면서 건

나. 발효를 이용한 제품개발

(1) 발효과정에서 ginsenoside의 함량 변화 관찰

- 건조한 각각의 시료들을 유효 성분의 용출이 용이하도록 이축압축 성형기를 이용하여 각각의 입자 크기가 평균 5 μm가 되게 초미세 분말을 만들었다. 그리고 인삼의 발효에 유용하다고 보고¹¹⁾된 유산균들로 혼합된 (주) cellbiotec(한국)의 ATP 혼합유산균 생균분말(*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium lactis*)을 각각의 삼미세분말에 1%씩 접종하여 37°C의 clean banch에서 최종 7일간 배양하였고, 배양 1, 2, 4, 7일째에 각각의 샘플을 채취한 후 HPLC를 이용하여 10종의 ginsenoside 함량 분석을 시행하였다.

다. 산 처리 및 효소를 이용한 제품개발

(1) 산첨가 인삼 분산액의 가열처리

- 인삼 5g을 증류수 250ml에 분산한 후 5M HCl 또는 10% 젓산을 가하여 pH를 5, 4.5, 4, 및 3.5로 조절한다. 121°C에서 15분간 가열처리하였다. 가열처리한 시료는 5M NaOH를 가하여 6.5로 조절하였다. 분석을 위해 채취한 일부 시료(0.5ml)에 동량의 1-butanol을 가하여 vortex하여 추출하고 원심분리하여 얻은 1-butanol 액을 원심분리농축기에 건조하였다. 건조물을 methanol에 용해하여 TLC로 분석하였다.

- 나머지 시료는 동결건조하였으며 건조된 인삼 분말(4~5g)을 80% methanol 200ml에 분산하여 1시간 환류 추출하였으며 여과하고 남은 잔사는 2차례 더 환류 추출하였다. 여과액은 rotary evaporator로 농축건조하였으며 증류수를 가하여 용해하였으며 ethyl acetate로 분액 추출하여 지용성 물질을 제거하고 수용액을 다시 동량의 1-butanol을 가하여 분액하였다. 추출물은 농축건조하였으며 건조물 5mg을 1ml의 methanol에 용해하여 HPLC 분석에 사용하였다.

(2) 인삼 ginsenosides 표준물의 효소 반응

- 0.06% ginsenosides와 0.4% 효소를 0.04 M 인산염 또는 초산염, 18% ethyl alcohol 수용액에서 용해하여 37°C에서 반응시킨 후 TLC로 분석하였다.

(3) 산첨가열처리인삼 분산액의 β -galactosidase AF 효소 처리

- 인삼 분산액(5g/250ml)에 젓산을 가하여 pH 4.0로 조절한 후 121°C에서 15분간 가열처리하였다. 열처리한 인삼분산액을 pH 4.5로 조절한 후 100mg의 β -galactosidase AF를 첨가하고 45°C에서 6, 12, 24, 및 48 시간 반응시킨 후 butanol 추출 및 농축건조한 후 methanol에 용해하여 TLC 분석하였다. 나머지는 HPLC 분석을 위해 환류추출과 분액을 하여 HPLC 분석에 사용하였다.

(4) 인삼분산액의 β -galactosidase FC30 효소 처리

- 인삼 분산액(5g/100ml)을 80°C에서 30분간 열처리한 후에 10% 젓산을 가하여 pH 4.5으로 조절한 후 100 mg의 β -galactosidase FC30을 가하여 용해시키고 50, 60, 및 70°C에서 각각 1, 2, 3일 반응시킨 후에 TLC와 HPLC 분석을 하였다.

(5) β -Galactosidase FC30 처리 인삼분산액의 β -galactosidase F 효소의 처리

- 인삼 분산액(5g/100ml)을 80°C에서 30분간 열처리한 후에 10% 젓산을 가하여 pH 4.5으로 조절한 후 100 mg의 β -galactosidase FC30을 가하여 용해시키고 60, 및 70°C에서 각각 1, 2, 3일 반응시킨 후에 100 mg의 β -galactosidase F를 가하여 용해시키고 55°C에서 24시간 반응하였다.

(6) TLC 분석

- Silica gel G-60 F₂₅₄ TLC plate를 사용하였으며 전개용매로는 chloroform-methanol-water (65:35:10)을 사용하고 전개한 후 20% 황산 알코올용액을 분무한 후 105-110°C에서 10분간 가열하여 발색시켰다.

(7) HPLC 분석

- HPLC 기기는 Varian 9012를 사용하였으며 Capcell Pak C18 (150×4.6mm) 컬럼을 사용하였으며 이동상은 Water와 acetonitrile을 82:18에서 20:80을 농도구배를 이용하였으며 유속은 1ml/min이고 검출 파장은 203 nm이었다.

3 절. 연구개발의 수행결과

1. 표준화 연구 결과

가. 산삼특이유전자 발굴

(1) SSH를 이용한 산삼의 특이유전자

(가) p-NRT2

- 인삼과 산삼을 객관적이고 과학적으로 감별하기 위한 특이적 유전자를 발굴하고자 suppressive subtraction hybridization 기법을 이용하여 인삼과 산양산삼 그리고 자연산 산삼의 유전적 차이를 규명하고자 하였다. 그 결과 산삼의 특이유전자인 고농도 질산 수송체 (high affinity nitrate transporter) 유전자 *NRT2* 유전자를 발견하였고, 이를 *pNRT2* 유전자라고 명명하였다. RT-PCR 분석결과 *pNRT2* 유전자는 산삼에서만 과잉 발현되고, 인삼에서는 발현이 관찰되지 않았다. 또한 자연산 산삼과 산양산삼의 비교분석에서는 *pNRT2* 유전자의 발현이 비슷하게 나타남을 알 수 있었다.
- *pNTR2* 유전자는 토양으로부터 질산을 흡수하는 역할을 하고 있음이 이미 알려져 있고, 산삼처럼 척박한 토양조건에서의 질소영양분의 중요성을 감안할 때, 산삼이나 산양산삼에서 *pNRT2* 유전자의 과 발현은 중요한 의미를 가지고 있다고 사료된다. 따라서 산삼에서 *pNRT2* 유전자의 중요성과 특이성은 산양산삼과 자연산 산삼의 중요한 특이적 마커가 될 수 있을 것으로 추정되었다(그림 6).

pNRT2

```

1                               40
GATGTTCCAT TCTGCATTAC ACATGGCTTG GGGTGGCATA
CGGTGGCGTT AACACCGAGG CAATCATCCT CTTGCCACGC
TCTGATCGGC TATTCTCGGC AACTTGAGA CTTCATTGT
GTAAACCTT CTGTTTTTCG TCCTCAGTCC ACTCGGATCC
ATAGTAGTGT TCTTCCGAGT GTTCTTCATT TTTCGAAGCT
GGGAAAAACA TGCTGCCCA TTGTGAAAG TCCACTAGTG
CCACAGGAAG AGTTAAAGCC ACAGCCATGA CTCCATCCA
GGTGAGACCT GTTGCAGTGG AGAATCTTGA GCCCGTAAAG
AAGATCAACT GCGTCAAACC GCCACCAAAG TTC
  
```

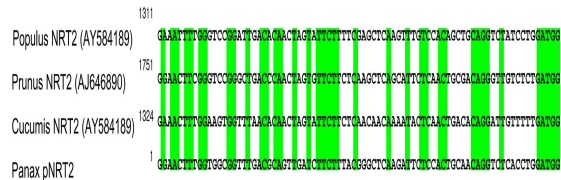


그림 6. *pNRT2* gene expression

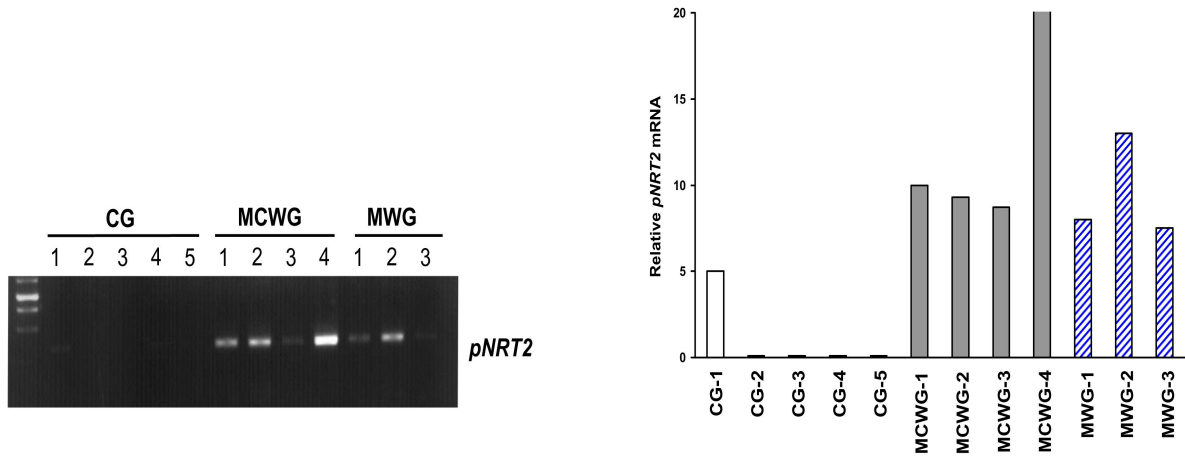


그림 7. Gene expression of *pNRT2*

(나) *p-GAPDH*

또한 동일한 방법으로 인삼과 구별되는 산삼의 특이 유전자인 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 발견하였고, pGAPDH-w 라고 명명하였다. RT-PCR 분석결과 pGAPDH-w 유전자는 산삼에서만 과잉 발현되고 인삼에서는 발현이 미미한 것으로 나타났다. 따라서 산삼에서 pGAPDH-w 유전자 발현의 양상은 인삼과 산삼을 감별할 수 있는 중요한 특이적 마커가 될 수 있을 것으로 추정되었다(그림 8-11).

CCTGGTGGTGCAAAGAAGGTTGTGATTTCTGCGCCTAGCAAGGATGCACCCATGTTTGTGTGGGT
 GTCAATGAGAAGGAATACAAGCCTGAACTTGACATTTGTCTCTAATGCTAGCTGCACTACCAATTGT
 CTTGCTCCTCTGGCCAAGGTTA**CATGAACTCCTTTTTCAAATACAAGTATATACTGGCATTGTTGAT**
ATATAAATTCAATAACCTCTGGTCTTTCTTCTTAAAATTTGCAGGTTGTTAATGATAGATTTGGCA
 TTGTTGAGGGGCTCATGACAGGGGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTC
 GGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCCTGGTTTCCAG

그림 8. Determined DNA sequence of putative wild Panax ginseng *pGAPDH-w* gene. (Novel sequence are in red)

(New)
pGAPDH-w AGCTGCACTAOCRAATTGICTTTGCTCCTCTGGCCRAAGGTTA**CATGAACTCCTTTTTCAATAACAAGTATAATACTGGCATTGTTGATATATAAATT**
pGAPDH AGTTGCACTAOCRAACTGICTTTGCTCCCTTGCAAAAGGTGA-----
 (Well known)
 -----**CAATAA****CCTCTGGTCTTTCTTCTTAAAAATTTTGCAGGTTG**TTAATGATAGATTGGCATTGTTGAGGGGCTCATGAC
 -----TTAACGATAGGTTTGGCATTGTTGAGGGGCTCATGAC

그림 9. DNA sequence alignment of *pGAPDH-w* gene with known *pGAPDH* genes across species. (Novel sequence are in red)



그림 10. Quantitative real-time RT-PCR analysis of *pGAPDH-w* transcripts.

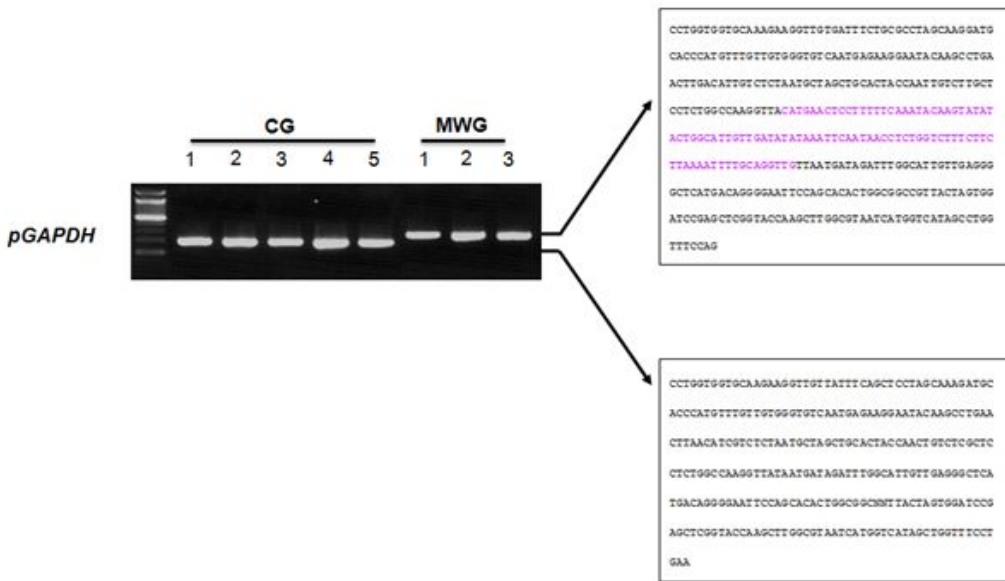


그림 11. RT-PCR analysis of differential expression of *pGAPDH-w* genes.

(다) *p-psbB*

- 또 다른 산삼의 특이 유전자로 식물체의 유전자인 chloroplast *p-psbB* 유전자를 발견하였고, 이는 thylakoid membrane 내에 위치하면서 빛에 대한 감작을 담당하는 역할을 하는 것으로 추정된다. RT-PCR 분석결과 chloroplast *p-psbB* 유전자는 산삼에서만 과잉 발현되고 인삼에서는 발현이 크게 나타나지 않는 것으로 관찰되었다.
- 따라서 산삼에서 chloroplast *p-psbB* 유전자의 발현 양상은 인삼과 산삼을 감별할 수 있는 중요한 특이적 마커가 될 수 있을 것으로 추정되었다(그림 12-16).

CCTGATCCCATTGATAACGAGTAGGCCCAAATAATTCGATCAGGGTAGTTGCTGAACCATACCACA
 TAGTTCGGCAACAACAAAAGCTGCAAAAAGACAGCAGCGATACTACTGAAAGGACGGTTTCAA
 TATTGCCCATACGCAATCCTTTGTATAGACGTTGGGGCGGGCGGACACTAAGATGGAATAGACCGG
 CCAATATACCCAATGTCCCTGCTGCAATATGATGAGAGGCTATTCCTCCCGGAACAAAAGGATCAA
 AACCTTCCACACCCCACGCTGGATTACAGATT

그림 12. Determined partial DNA sequence of putative Panax ginseng Chloroplast *rpo-psbB* gene

```

1 ATG GGT TTG CCI TGG TAT CGT GTT CAT ACC GTT GTA TTG AAT GAT CCC GGC CGG TTG CTT TCT GTC CAT ATA ATG 75
1 M G L P W Y R V H T V V L N D P G R L L S V H I M 25
76 CAT ACA GCT CTA GTT GCT GGT TGG GCG GGT TGG ATG GCT CTA TAT GAA TTA GCA GTT TTT GAT CCC TCT GAC CCT 150
26 H T A L V A G W A G S M A L Y E L A V F D P S D P 50
151 GTT CTT GAT CCA ATG TGG AGA CAG GGT ATG TTC GTT ATA CCC TTC ATG ACT CGT TTA GGA ATA ACC AAT TCA TGG 225
51 V L D P M W R Q G M F V I P F M T R L G I T N S W 75
226 GGC GGT TGG AGT GTC ACA GGA GGG GCT ATA CCG AAT CCG GGT ATT TGG AGT TAC GAA GGT GTG GCC GGG GCA CAT 300
76 G G W S V T G G A I P N P G C I W S Y E G V A C A H 100
301 ATT GTG TTT TCT GGC TTG TGC TTC TTG GCA GCT ATC TGG CAT TGG GTT TAT TGG GAT CTA GAA ATT TTT TCT GAT 375
101 I V F S G L C F L A A I W H W V Y W D L E I F S D 125
376 GAA CGT ACA GGA AAA CCT TCT TTG GAT TTG CCC AAG ATC TTT GGA ATT CAT TTA TTT CTC GCA GGG GTG GCT TGC 450
126 E R T G K P S L D L P K I F G I H L F L A G V A C 150
451 TTT GGT TTT GGT GCA TTT CAT GTA ACA GGC TTG TAT GGT CCI GGA ATA TGG GTG TCT GAT CCT TAT GGA CTA ACG 525
151 F G F G A F H V T G L Y G P G I W V S D P Y G L T 175
526 GGA AAA GTA CAA TCT GTA AAT CCA CCG TGG GGT GTG GAA GGT TTT GAT CCT TTT GTT CCG GGA GGA ATA GCC TCT 600
176 G K V Q S V N P A W G V E G F D P F V P G G I A S 200
601 CAT CAT AIT GCA GCA GGG ACA TTG GGT ATA TTG GCC GGT CTA TTC CAT CTT AGT GTC CCG CCG CCA CGT CTA 675
201 H H I A A G T L G I L A G L F H L S V R P P Q R L 225
676 TAC AAA GGA TTG CCI ATG GGC AAT ATT GAA ACC GTC CTT TCC AGT AGT ATC GCT GCT GTC TTT TTT GCA GCT TTT 750
226 Y K G L R M G N I E T V L S S S I A A V F F A A F 250
751 GTT GTT GGC GGA ACT ATG TGG TAT GGT TCA GCA ACT ACC CCG ATC GAA TTA TTT GGG CTT ACT CGT TAT CAA TGG 825
251 V V A G T M W Y G S A T T P I E L F G P T R Y Q W 275
826 GAT CAG GGG TAC TTC CAG CAA GAG ATA TAT CGA AGA GTT AGT GCT GGG CTA GCC GAA AAT CAA AGT TTA TCA GAA 900
276 D Q G Y F Q Q E I Y R R V S A G L A E N Q S L S E 300
901 GGT TGG TCT AAA ATT CCT GAA AAA TTA GCT TTT TAT GAT TAC ATC GGC AAT AAT CCG GCA AAA GGG GGA TTA TTC 975
301 A W S K I P E K L A F Y D Y I G N N P A K G C L F 325
976 AGA GCG GGT TCA ATG GAT AAC GGG GAT GGA ATA GCG GTT GGA TGG TTA GGA CAT CCT ATC TTT AGA GAT AAA GAA 1050
326 R A G S M D N G D G I A V G W L G H P I F R D K E 350
1051 GGG CGT GAA CTT TTT GTA CGT CGT ATG CCT ACC TTT TTT GAA ACC TTT CCG GTC GTT TTG GTA GAT GGC GAC GGA 1125
351 G R E L F V R R M P T F F E T F P V V L V D G D G 375
1126 ATT GTT AGA GCC GAT GTT CCT TTT CGA AGG GCA GAA TCG AAG TAT AGT GTC GAA CAA GTA GGT GTA ACT GTT GAG 1200
376 I V R A D V P F R R A E S K Y S V E Q V G V T V E 400
1201 TTC TAC GGC GGC GAA CTC AAC GGA GTC AGT TAT AGT GAT CCI GCT ACT GTG AAA AAA TAT GCT AGA CGT GCT CAA 1275
401 F Y G G E L N G V S Y S D P A T V K K Y A R R A Q 425
1276 TTG GGT GAA ATT TTT GAA TTA GAT CGT GCT ACT TTG AAA TCC GAT GGT GTT TTT CGT AGC AGT CCG AGG GGT TGG 1350
426 L G E I F E L D R A T L K S D G V F R S S P R G W 450
1351 TTT ACT TTT GGA CAT GCT TCT TTT GCT TTG CTC TTC TTT TTT GGA CAT ATT TGG CAT GGT GCT AGA ACC TTG TTC 1425
451 F T F G H A S F A L L F F F G H I W H G A R T L F 475
1426 AGA GAT GTT TTT GCT GGT ATT GAT CCA GAT TTG GAT GCT CCA GTA GAA TTT GGA GCA TTC CAA AAA CTC GGA GAT 1500
476 R D V F A G I D P D L D A Q V E F G A F Q K L G D 500
1501 CCA ACT ACA AGA AGA CAA GTA GTC TGA 1538
501 P T T R R Q V V * 509
    
```

그림 13. Nucleotide and predicted amino acid sequences of Panax ginseng *p-psbB*.

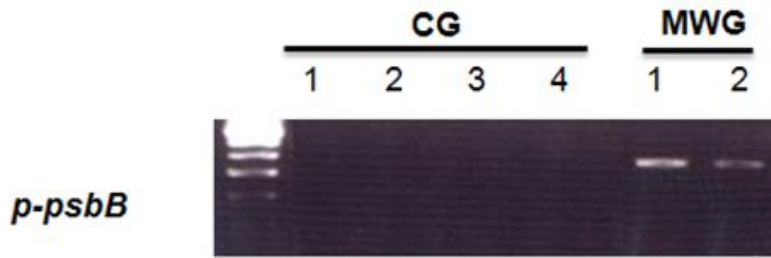


그림 14. RT-PCR analysis of differential expression of *p-psbB* genes.

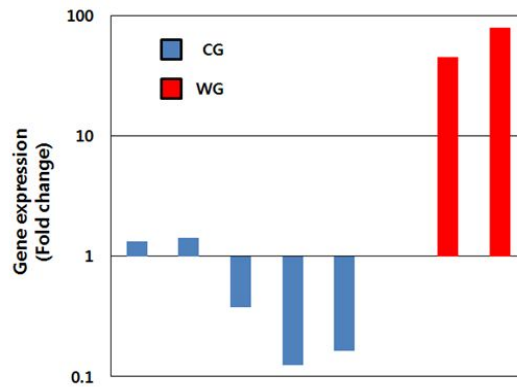


그림 15. Quantitative real-time RT-PCR analysis of *p-psbB* transcripts.

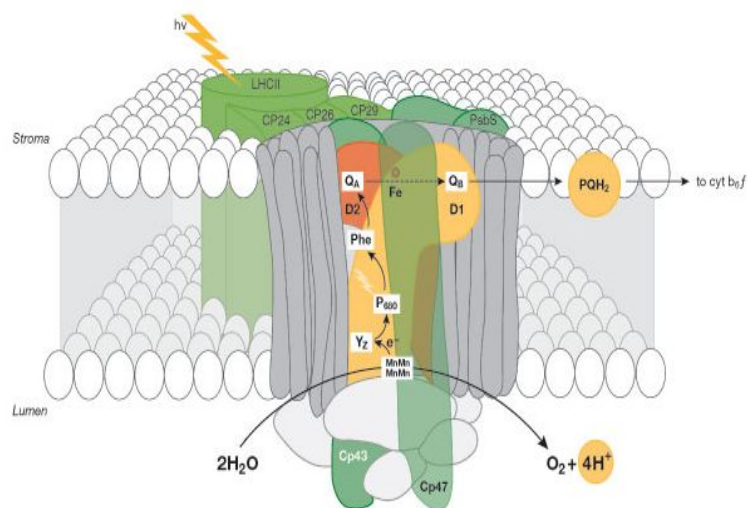


그림 16. Organization of photosystem II and *p-psbB* (Cp47) protein in the thylakoid membrane.

(라) chloroplast *p-rpoC1*

- 인삼과 산삼의 유전적 차이를 규명하고자 하는 목적으로 수행된 유전자 발굴의 연구에서 산삼에서만 특이적으로 과 발현되는 또 다른 유전자인 식물체의 *rpoC1* 유전자를 발견하였고, RT-PCR 분석결과 chloroplast *rpoC1* 유전자는 산삼에서만 과잉 발현되고 인삼에서는 발현이 관찰되지 않았다.
- 따라서 산삼에서 chloroplast *rpoC1* 유전자의 발현 양상은 인삼과 산삼을 감별할 수 있는 중요한 특이적 마커가 될 수 있을 것으로 추정되었다(그림 17-18).

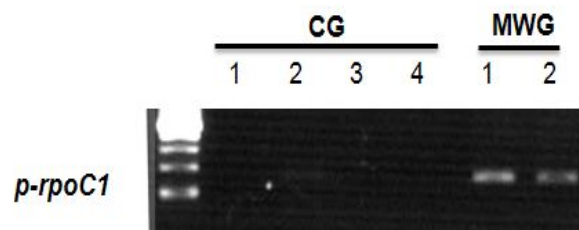


그림 17. RT-PCR analysis of differential expression of *p-rpoC1* genes.

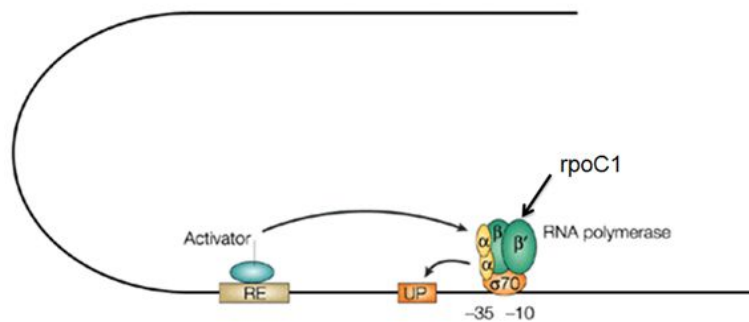


그림 18. Schematic diagram of *rpoC1* subunit in RNA polymerase.

(마) 인삼의 genomic DNA를 규명하기 위한 PCR-RAPD의 분석 결과 한국산 인삼과 산양삼, 그리고 중국산 산양삼의 DNA를 추출한 후 1.0% agarose gel을 이용하여 특이적으로 발현하는 유전자가 있는지를 관찰하였다. 그 결과 중국산 산양삼과 한국산 산양삼에서 특이적으로 발현하는 유전자가 있음을 확인할 수 있었다(그림 19-23).

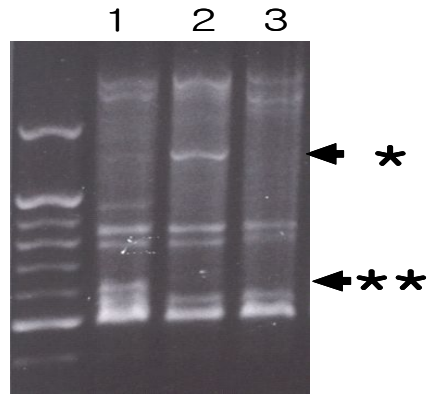


그림 19. PCR-RAPD를 이용한 유전자 분석-1. 중국산 산양삼, 2. 한국산 인삼, 3. 한국산 산양삼

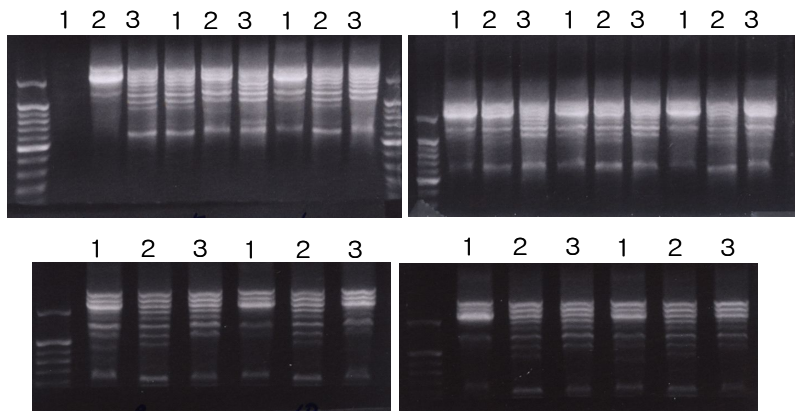


그림 20. RAPD using primer-3. 1, Chinse ginseng; 2, Panax ginseng; 3, Cultivated-wild ginseng.

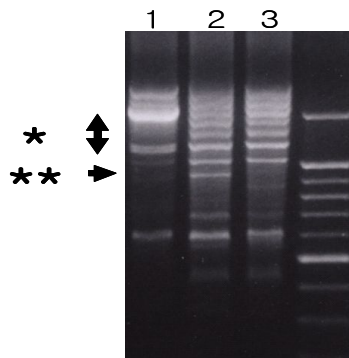


그림 21. the difference of RAPD using primer-3. 1, Chinse ginseng; 2, Panax ginseng; 3, Cultivated-wild ginseng. *, 1000-1500 bp DNA fragment; **, 900 bp DNA fragment.

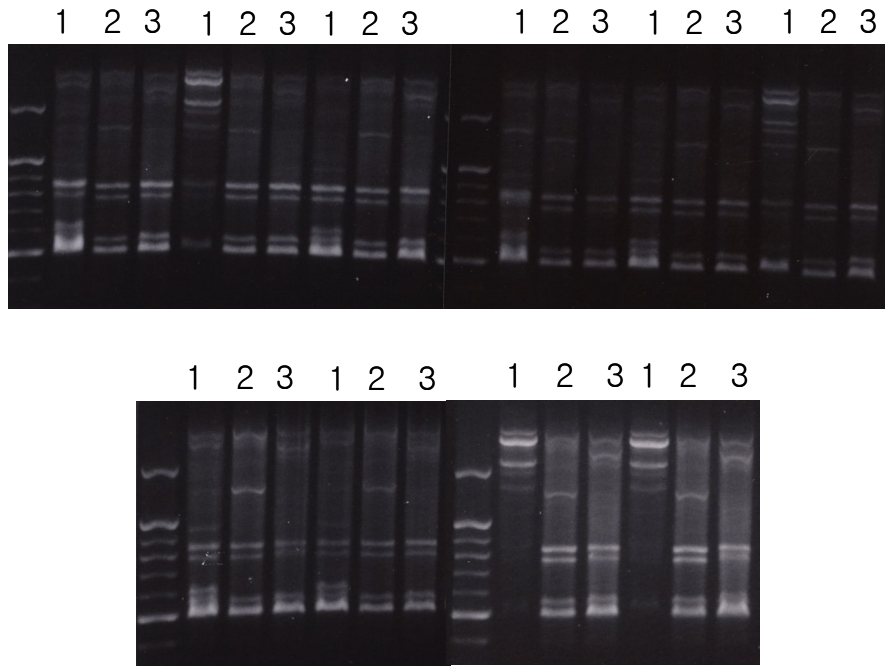


그림 22. RAPD using primer-9. 1, Chinse ginseng; 2, Panax ginseng; 3, Cultivated-wild ginseng.

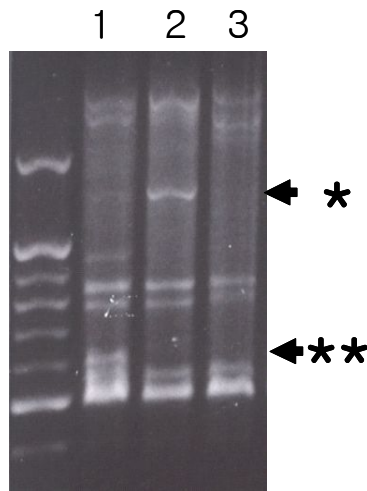


그림 23. the difference of RAPD using primer-9. 1, Chinse ginseng; 2, Panax ginseng; 3, Cultivated-wild ginseng. *, 1000-1500 bp DNA fragment: **, 600 bp DNA fragment

- 본 연구를 수행한 결과 인삼과 차별화되는 자연산 산삼에 가장 근접한 산양산삼이라는 제품을 개발할 수 있는 구체적 방법론을 확보할 수 있었고, 이를 통하여 농촌 경제의 새로운 활로 모색과 국민 보건에 기여할 수 있는 우수 제품의 개발, 그리고 무방비 상태의 영터리 산양 삼으로부터 자연산 산삼의 진품을 보호할 수 있는 진단 기술을 확보하는 것이 가능함을 알 수 있었다. 또한 우수 유전자원의 확보를 바탕으로 장기적인 품질관리를 지속한다면 그 효능이나 가치를 고려해본다면 산양삼의 미래는 매우 밝다고 볼 수 있었다.

나. Ginsenoside 함량분석

(1) 부위에 따른 함량분석

- 인삼과 산양산삼 그리고 자연산 산삼에 대한 성분분석을 시행한 결과 부위에 따라 수종의 진세노사이드의 함량에서는 인삼과 중국산 산양산삼이 유사한 분포를 나타내었고, 한국산은 5년근과 10년근이 매우 유사한 분포를 나타내고 있었다(그림 24-26).

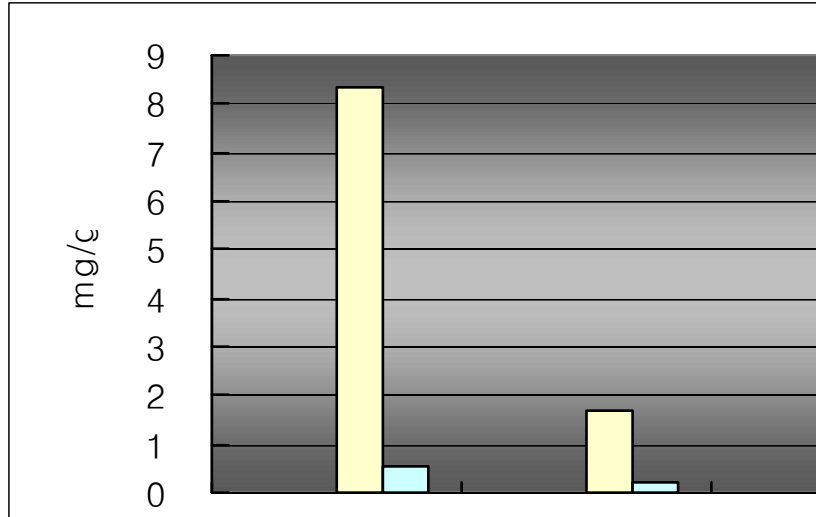


그림 24. 수종의 삼에서 잎에 함유된 진세노사이드 함량 비교

CG: 인삼, 5y K-CWG: 5년근 한국산 산양산삼, 10y K-CWG: 10년근 한국산 산양산삼
 10y C-CWG: 10년근 중국산 산양산삼, WG: 20-30년 한국산 자연산 산삼

Rg3: ginsenoside-Rg3, Rh2: ginsenoside-Rh2, Rg1: ginsenoside-Rg1, Rb1: ginsenoside-Rb1

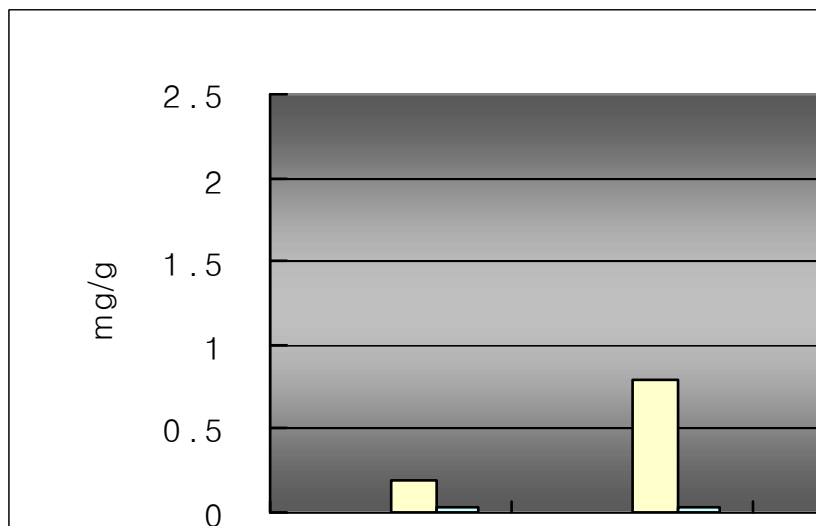


그림 25. 수종의 삼에서 줄기에 함유된 진세노사이드 함량 비교

CG: 인삼, 5y K-CWG: 5년근 한국산 산양산삼, 10y K-CWG: 10년근 한국산 산양산삼

10y C-CWG: 10년근 중국산 산양산삼, WG; 20-30년 한국산 자연산 산삼

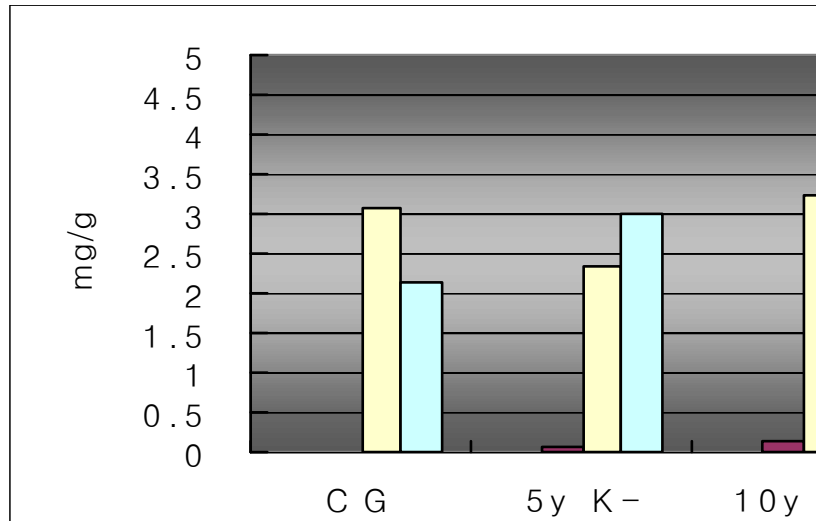


그림 26. 수종의 삼에서 뿌리에 함유된 진세노사이드 함량 비교

CG: 인삼, 5y K-CWG: 5년근 한국산 산양산삼, 10y K-CWG: 10년근 한국산 산양산삼
10y C-CWG: 10년근 중국산 산양산삼, WG; 20-30년 한국산 자연산 산삼

(2) 자연산 산삼과 국내산, 그리고 중국산 산양삼의 성분분석 결과

(가) 수종의 삼들에 대한 HPLC analysis of ginsenoside-Rg3 and ginsenoside-Rh2

- 비극성 사포닌인 ginsenoside-Rg3 and ginsenoside-Rh2의 peak를 상기한 조건하에서 구하였다. Ginsenoside-Rg3는 모든 시료에서 확인되었으며 특히 자연산 산삼에서 함량이 상대적으로 많음을 알 수 있었다. 그러나 수령과 산지를 감별할 수 있는 지표물질로는 사용이 어렵다고 판단되었다.
- Ginsenoside-Rh2 역시 모든 시료에서 확인이 되었다. 상대적인 함량의 비교에서는 자연산이 가장 많았고, 국내산이 그 다음, 중국산에서 가장 적은 함량을 나타내었다. 이는 ginsenoside-Rh2가 자연산과 국내산, 그리고 중국산의 삼을 구분하는데 중요한 지표물질이 될 수 있음을 시사하는 것이다.

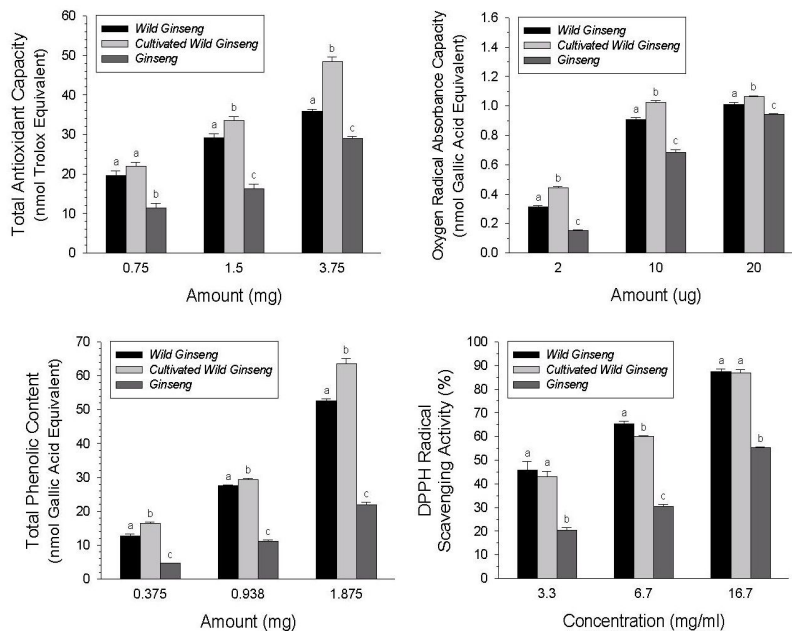
(나) 수종의 삼들에 대한 HPLC analysis of ginsenoside-Rb1 and ginsenoside-Rg1

- 극성 사포닌의 주성분인 ginsenoside-Rb1 and ginsenoside-Rg1의 패턴 분석을 수행하기 위하여 상기한 조건으로 peak를 구하였다. 그 결과 모든 시료에서 ginsenoside-Rb1 and ginsenoside-Rg1을 함유하고 있었고, 함량의 분포차이가 명확히 나타나지 않음을 알 수 있었다.
- 따라서 ginsenoside-Rb1 and ginsenoside-Rg1은 자연산과 국내산, 그리고 중국산을 감별하기위한 기준물질로 적합하지 않음을 알 수 있었다.

2. 효능연구

가. 항산화 효능 비교연구

- 산양산삼이 치매, 파킨슨씨 병, 비만, 당뇨 등의 주 발생 원인으로 작용하는 산화작용을 억제하는 효과가 있는 가를 알아보기 위하여 수종의 항산화 방법을 이용하여 효능을 평가한 결과 산양산삼은 자연산 산삼과 거의 유사한 항산화 효능이 있음을 밝혔다. 또한 산양산삼과 자연산 산삼은 인삼에 비하여 월등한 항산화 효능이 있음을 알 수 있어 자연산 산삼에 비하여 가격이나 공급 등에서 탁월한 경쟁력을 확보하고 있는 산양산삼을 어떻게 활용할 것인가에 대한 고민이 시대적으로 요구되는 바이다.
- 자연산 산삼(이하 산삼)과 산양삼, 그리고 인삼의 항산화 효능을 비교·평가하고자 총 항산화능을 측정할 수 있는 Total antioxidant capacity(TAC), Oxygen radical absorbance capacity(ORAC)와 항산화 측정에 사용되는 Total phenolic content, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거 활성, 지질과산화 그리고 Reactive oxygen species (ROS) 등을 측정한 결과 인삼은 산삼이나 산양삼에 비하여 전반적으로 낮은 항산화능을 나타내었다.
- 따라서 수령 10년의 산양삼은 산삼에 비하여 항산화능이 유사하거나 우수한 것으로 밝혀져 산화기전으로 인한 질병의 예방을 목적으로 사용할 때에는 산양삼이 자연산 산삼의 대체 한약재로 손색이 없을 것으로 판단되었다(그림 27).



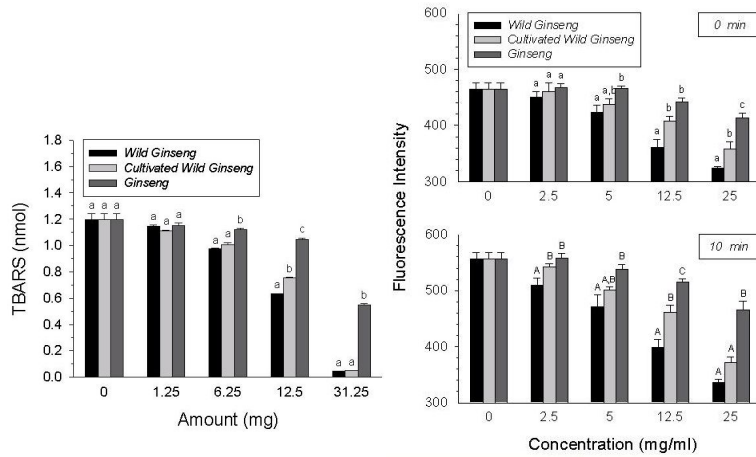


그림 27. 인삼, 산양삼 및 자연산 산삼의 항산화 효능-1

- 상기한 산양삼과 인삼의 항산화 효능을 또 다른 방법으로 비교·평가하고자 superoxide와 hydroxyl radical 소거 활성을 측정한 결과 인삼 및 산양삼추출물의 농도가 증가함에 따라 superoxide radical 소거활성도 농도 의존적으로 증가하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 hydroxyl radical 소거활성에서도 동일하게 나타나 인삼에 비하여 산양삼의 항산화 작용이 우수함을 확인할 수 있었다 (그림 28).

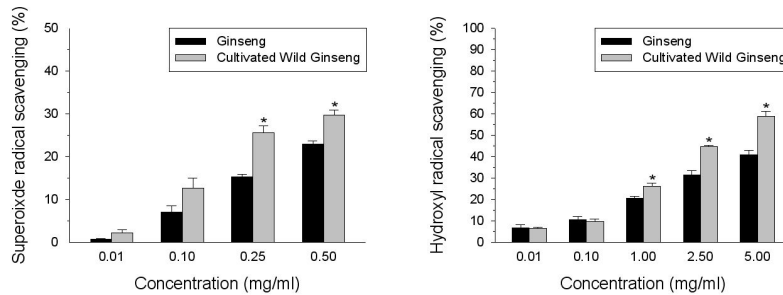


그림 28. 인삼과 산양삼의 항산화 효능 비교 2

나. 항암효능

(1) AXIN2 유전자의 발현억제

- 산양산삼의 항암효능 규명을 위한 유전자 분석을 시행하였다. 그 결과 산양산삼이 epithelial-mesenchymal transition (EMT) 과정의 중요한 조절 유전자인 AXIN2 유전자의 발현⁹⁻¹²⁾을 억제함을 밝혔다. 인간 대장암세포주인 LOVO 세포 및 인간 위암세포인 SNU601 세포에 산양산삼을 처리한 경우 농도가 증가함에 따라서 AXIN2 유전자의 발현이 줄어들음을 관찰하였다. 반면에, 산양산삼의 처리는 암전이 억제 유전자로 알려진 *maspin*과 *nm23* 유전자의 발현에는 영향을 미치지 못하였다. 더구나 인삼과

약효의 비교실험에서 산양산삼은 AXIN2 유전자 억제 효과가 뛰어났으며 자연산삼과는 비슷한 효과를 보였다. 따라서 결론적으로 산양산삼의 항 전이효과의 기전으로서 AXIN2 유전자의 억제효과를 통한 EMT 과정의 조절기전이 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 판단되었다(그림 29).

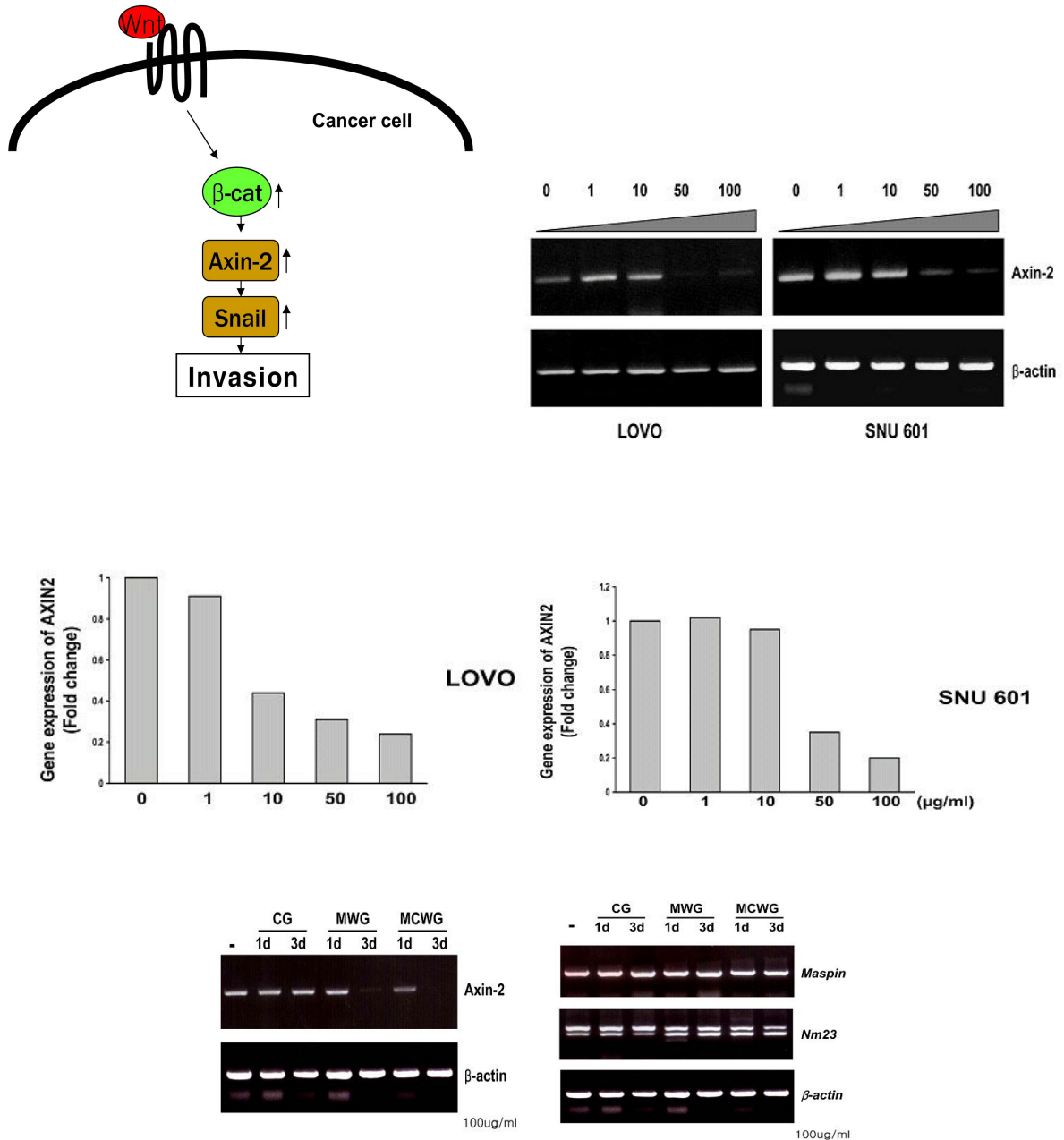


그림 29. 산양산삼의 항암효능 규명결과: 암의 전이에 관여하는 AXIN2 유전자의 활성을 산양산삼이 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

(나) 대장암세포의 성장 억제효능

- CT-26 대장암세포를 생쥐의 복강에 주입하여 복강암을 유발한 후 암종의 성장을 측정한 결과 산양산삼이나 자연산 산삼을 복용한 쥐에서 암세포의 성장이 대조군에 비하여 유의하게 억제되고 있음을 알 수 있었다(그림 30).

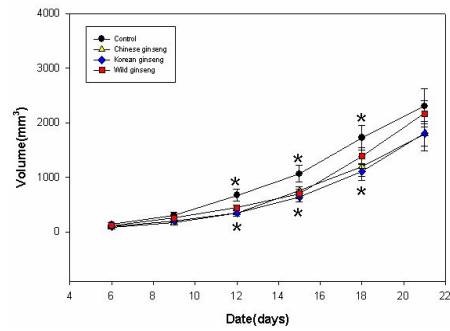


그림 30. 수종의 삼에 대한 복강암세포의 성장억제효과-자연산산삼과 산양산삼이 거의 유사하게 암세포의 성장을 유의하게 억제하고 있음.

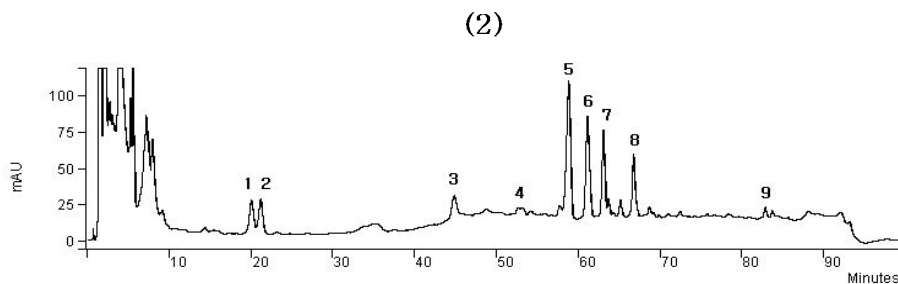
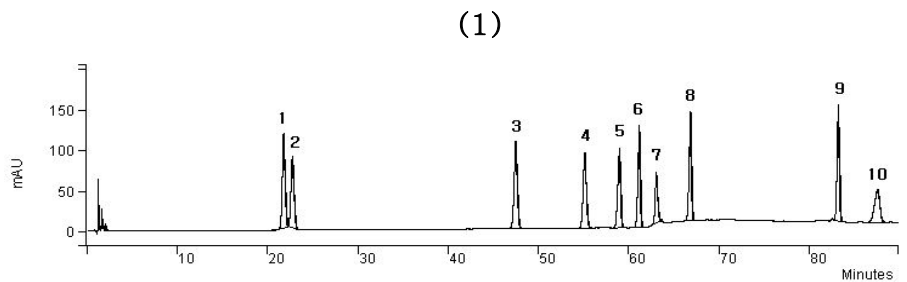
3. 제품개발 연구결과

가. 열처리 과정에서 각 시료의 ginsenosides 함량 변화 결과

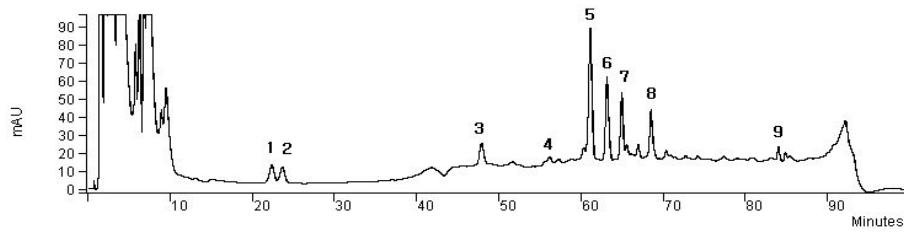
- 각 종 삼류에 증숙 과정을 통한 열 자극을 준 결과 ginsenoside의 함량에 변화가 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3-11).
- 4년근 삼에서는 홍삼화 과정으로 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁ 그리고 Rh₁이 증가하였고, 특히 Re와 Rf는 거의 2배 상승하였으며 Rg₃는 큰 변화를 나타내지 않았다.
- 6년근 삼에서는 홍삼화 과정으로 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Re, 그리고 Rg₁ 이 소폭 증가하였고, Rc, Rd, Rf, Rg₃ 그리고 Rh₁은 큰 변화를 나타내지 않았다.
- 산양삼은 홍삼화 과정으로 ginsenoside Re, Rf, Rg₁, Rg₃ 그리고 Rh₁이 증가하였고 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc는 감소하였다. 그리고 ginsenoside Rd는 큰 변화를 나타내지 않았다(그림 31).

나. 발효과정에서 ginsenosides의 함량변화 결과

- 건조한 각각의 시료들을 초미세 분말로 만든 후 유산균들로 혼합된 (주) cellbiotec(한국)의 ATP 혼합유산균 생균분말(*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium lactis*)을 각각의 삼 미세분말에 1%씩 접종하여 37°C의 clean banch에서 최종 7일간 배양하였고, 배양 1, 2, 4, 7일째에 각각의 샘플을 채취한 후 HPLC를 이용하여 10종의 ginsenoside 함량 분석을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.



(3)



(4)

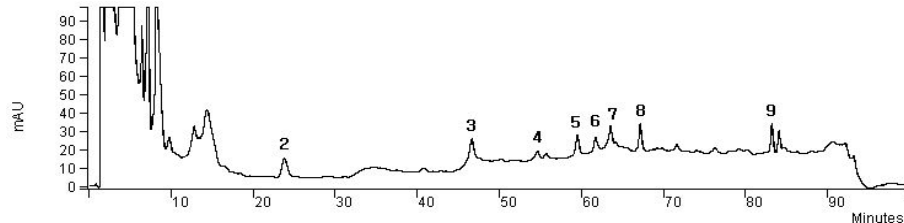


그림 31. (1) HPLC chromatogram of standard ginsenosides.; 1: ginsenoside Rg₁, 2: ginsenoside Re, 3: ginsenoside Rf, 4: ginsenoside Rh₁, 5: ginsenoside Rb₁, 6: ginsenoside Rc, 7: ginsenoside Rb₂, 8: ginsenoside Rd, 9: ginsenoside Rg₃, 10: ginsenoside Rh₂.
HPLC chromatogram of cultivated ginseng 4 years(2), cultivated ginseng 6 years (3) and cultivated wild ginseng (4) of fermented 7 days by lactic acid and bacteria.

(1). Ginsenoside Rb₁의 함량 변화

- 발효과정에서 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rb₁의 함량 분석을 실시한 결과 4년 근 인삼은 6.86 mg/g에서 발효 1일째 5.64 mg/g으로 줄다가 2일째는 6.54 mg/g으로 증가하였고, 4일에는 5.78 mg/g, 7일째에는 5.44 mg/g을 나타내어 소폭 감소하는 경향을 나타내었다.
- 6년근 인삼은 5.15 mg/g에서 발효 1일째 5.04 mg/g으로, 2일째는 4.27 mg/g, 4일에는 3.27 mg/g, 그리고 7일째에는 2.69 mg/g을 나타내어 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었다.
- 산양삼은 2.85 mg/g에서 발효 1일째 1.69 mg/g으로, 2일째는 2.31 mg/g, 4일에는 2.09 mg/g, 그리고 7일째에는 0.35 mg/g을 나타내었는데 지속적으로 감소하는 경향을 나타내다가 발효 7일째에 급격한 감소를 나타내었다(그림. 32).

(2) Ginsenoside Rb₂의 함량 변화

- 발효과정에서 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rb₂의 함량 분석을 실시한 결과 4년 근 인삼은 4.86 mg/g에서 발효 1일째 4.17 mg/g으로 줄다가 2일째는 4.71 mg/g으로 소폭 증가하였고, 4일에는 4.34 mg/g, 7일째에는 4.27 mg/g을 나타내어 소폭 감소하는 경향을 나타내었으나 그 변화는 크지 않았다.
- 6년근 인삼은 2.93 mg/g에서 발효 1일째 2.96 mg/g으로, 2일째는 2.93 mg/g, 4일에는 2.89 mg/g, 그리고 7일째에는 2.31 mg/g을 나타내어 변화가 거의 나타나지 않다가 발효 7일째에 감소함을 알 수 있었다.

- 산양삼은 2.27 mg/g에서 발효 1일째 1.40 mg/g으로, 2일째는 1.79 mg/g, 4일에는 1.69 mg/g, 그리고 7일째에는 0.40 mg/g을 나타내었는데, 지속적으로 감소하는 경향을 나타내다가 발효 7일째에 급격한 감소를 나타내었다(그림. 32).

(3) Ginsenoside Rc의 함량 변화

- 발효과정에서 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rc의 함량 분석을 실시한 결과 4년근 인삼은 4.42 mg/g에서 발효 1일째 3.82 mg/g으로 줄다가 2일째는 4.30 mg/g으로 소폭 증가하였고, 4일에는 4.00 mg/g, 7일째에는 3.72 mg/g을 나타내어 발효 과정이 진행될수록 소폭 감소하는 경향을 나타내었으나 그 변화는 크지 않았다.
- 6년근 인삼은 2.61 mg/g에서 발효 1일째 2.87 mg/g으로 소폭 증가하였다가, 2일째는 2.49 mg/g, 4일에는 2.00 mg/g, 그리고 7일째에는 1.63 mg/g을 나타내어 발효가 진행될수록 점차 감소함을 알 수 있었다.
- 산양삼은 1.78 mg/g에서 발효 1일째 1.14 mg/g으로, 2일째는 1.54 mg/g, 4일에는 1.35 mg/g, 그리고 7일째에는 0.22 mg/g을 나타내었는데, 발효 7일째에 급격한 감소를 나타내었다(그림. 32).

(4) Ginsenoside Rd의 함량 변화

- 발효과정에서 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rd의 함량 분석을 실시한 결과 4년근 인삼은 1.79 mg/g에서 발효 1일째 1.69 mg/g으로, 2일째는 1.77 mg/g, 4일에는 1.69 mg/g, 7일째에는 1.55 mg/g을 나타내어 그 변화는 크지 않았다.
- 6년근 인삼은 0.96 mg/g에서 발효 1일째 1.11 mg/g으로, 2일째는 1.01 mg/g, 4일에는 1.06 mg/g, 그리고 7일째에는 0.77 mg/g을 나타내어 발효과정에서 거의 변화하지 않다가 발효 7일째에 감소함을 알 수 있었다.
- 산양삼은 0.73 mg/g에서 발효 1일째 0.71 mg/g으로, 2일째는 0.90 mg/g, 4일에는 0.86 mg/g, 그리고 7일째에는 0.36 mg/g을 나타내었는데, 초기에는 증가하는 경향을 나타내다가 발효 7일째에 급격한 감소를 나타내었다(그림. 32).

(5) Ginsenoside Re의 함량 변화

- 발효과정에서 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Re의 함량 분석을 실시한 결과 4년근 인삼은 2.06 mg/g에서 발효 1일째 1.38 mg/g으로 줄다가 2일째는 1.67 mg/g으로 소폭 증가하였고, 4일에는 1.14 mg/g, 7일째에는 0.88 mg/g을 나타내어 발효과정이 진행될수록 점차 감소하는 경향을 나타내었다.
- 6년근 인삼 역시 1.19 mg/g에서 발효 1일째 0.93 mg/g으로, 2일째는 0.67 mg/g, 4일에는 0.53 mg/g, 그리고 7일째에는 0.42 mg/g을 나타내어 발효과정이 진행될수록 함량이 감소함을 알 수 있었다.
- 산양삼은 0.66 mg/g에서 발효 1일째 0.27 mg/g으로, 2일째는 0.48 mg/g, 4일에는 0.41 mg/g, 그리고 7일째에는 0.59 mg/g을 나타내어 초기에는 감소하는 경향을 나타내다가 점차 증가하여 전체적으로는 그 변화가 크지 않았다(그림. 32).

(6) Ginsenoside Rf의 함량 변화

- 발효과정에서 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rf의 함량 분석을 실시한 결과 4년근 인삼은 0.48 mg/g에서 발효 1일째 0.87 mg/g으로 늘다가 2일째는 0.79 mg/g으로 소폭 감소하였고, 4일과 7일째에는 0.72 mg/g을 나타내어 소폭 증가하였다.
- 6년근 인삼은 0.64 mg/g에서 발효 1일째 0.64 mg/g, 2일째는 0.61 mg/g, 4일에는 0.52 mg/g, 그리고 7일째에는 0.47 mg/g을 나타내어 변화가 거의 나타나지 않음을 알 수 있었다.
- 산양삼은 0.37 mg/g에서 발효 1일째 0.37 mg/g, 2일째는 0.45 mg/g, 4일에는 0.34 mg/g, 그리고 7일째에는 0.48 mg/g을 나타내어 역시 그 변화가 크지 않았다(그림. 32).

(7) Ginsenoside Rg₁의 함량 분석

- 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rg₁의 함량 분석을 실시한 결과 4년근 인삼은 1.78 mg/g에서 발효 1일째 1.20 mg/g으로 줄다가 2일째는 1.37 mg/g으로 소폭 증가하였고, 4일에는 0.93 mg/g, 7일째에는 0.73 mg/g을 나타내어 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었다.
- 6년근 인삼은 1.29 mg/g에서 발효 1일째 0.86 mg/g으로, 2일째는 0.64 mg/g, 4일에는 0.47 mg/g, 그리고 7일째에는 0.41 mg/g을 나타내어 발효 과정에 의해 지속적으로 감소함을 알 수 있었다.
- 산양삼은 0.38 mg/g에서 발효 1일째 0.17 mg/g으로, 2일째는 0.26 mg/g, 4일에는 0.25 mg/g, 그리고 7일째에는 0.00 mg/g을 나타내었는데, 발효 7일째에 급격한 감소를 나타내어 분해 과정에 의해 완전히 분해됨을 알 수 있었다(그림. 32).

(8) Ginsenoside Rg₃의 함량 분석

- 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rg₃의 함량 분석을 실시한 결과 4년근 인삼은 0.17 mg/g에서 발효 1일째 0.13 mg/g으로 줄다가 2일째는 0.15 mg/g, 4일에는 0.18 mg/g, 그리고 7일째에는 0.19 mg/g을 나타내어 그 변화는 크지 않았다.
- 6년근 인삼은 0.16 mg/g에서 발효 1일째 0.12 mg/g으로, 2일째는 0.09 mg/g, 4일에는 0.11 mg/g, 그리고 7일째에는 0.16 mg/g을 나타내어 감소와 증가의 과정을 나타내었으나 함량에는 큰 영향을 미치지 않았다.
- 산양삼은 0.12 mg/g에서 발효 1일째 0.16 mg/g으로, 2일째는 0.18 mg/g, 4일에는 0.16 mg/g, 그리고 7일째에는 0.31 mg/g을 나타내어, 발효 7일째에 급격한 함량의 증가를 나타내었다(그림. 32).

(9) Ginsenoside Rh₁의 함량 분석

- 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rh₁의 함량 분석을 실시한 결과 4년근 인삼은 0.18 mg/g에서 발효 1일째 0.12 mg/g으로 줄다가 2일째는 0.14 mg/g, 4일에는 0.15 mg/g, 그리고 7일째에는 0.16 mg/g을 나타내어 큰 변화를 나타내지 않았다.
- 6년근 인삼은 0.11 mg/g에서 발효 1일째 0.10 mg/g으로, 2일째는 0.12 mg/g, 4일에는

0.09 mg/g, 그리고 7일째에는 0.12 mg/g을 나타내어 변화가 거의 나타나지 않음을 알 수 있었다.

- 산양삼은 0.11 mg/g에서 발효 1일째 0.11 mg/g, 2일째는 0.14 mg/g, 4일에는 0.15 mg/g, 그리고 7일째에는 0.15 mg/g을 나타내어 약간 증가하는 양상을 보였으나 변화는 크지 않았다(그림. 32).

(10) Ginsenoside Rh₂의 함량 분석

- 수종의 삼류에 대하여 ginsenoside Rh₂의 함량 분석을 실시한 결과 모든 삼류에서 발견되지 않았고, 열처리 과정이나 발효과정에 의해서도 생성되지 않음을 알 수 있었다.

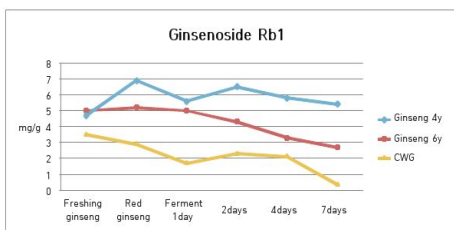


Fig. 2 Changes of ginsenoside Rb₁ contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

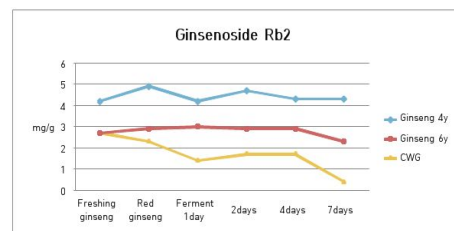


Fig. 3 Changes of ginsenoside Rb₂ contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

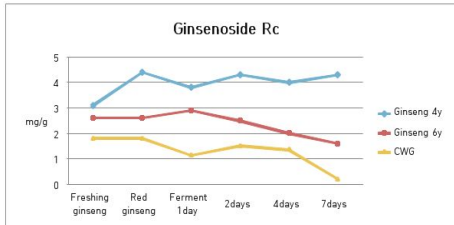


Fig. 4 Changes of ginsenoside Rc contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

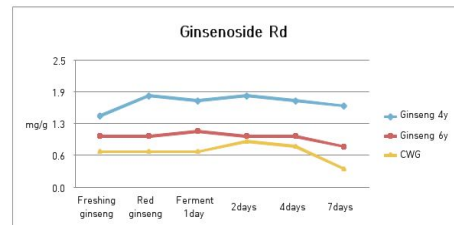


Fig. 5 Changes of ginsenoside Rd contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

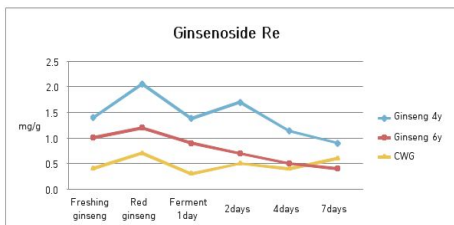


Fig. 6 Changes of ginsenoside Re contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

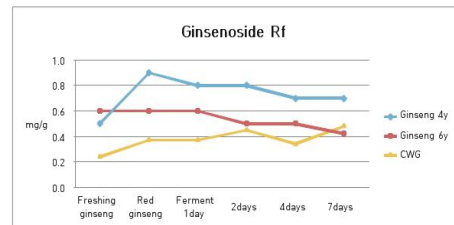


Fig. 7 Changes of ginsenoside Rf contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

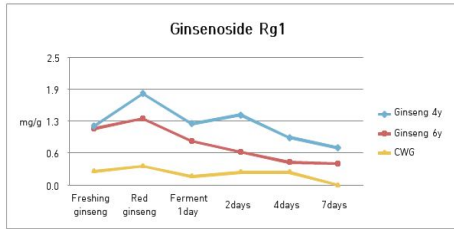


Fig. 8 Changes of ginsenoside Rg₁ contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

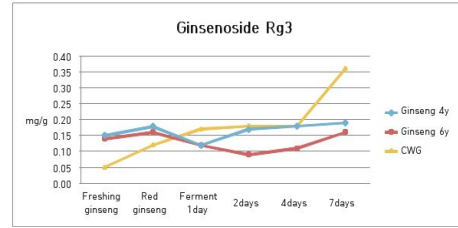


Fig. 9 Changes of ginsenoside Rg₃ contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

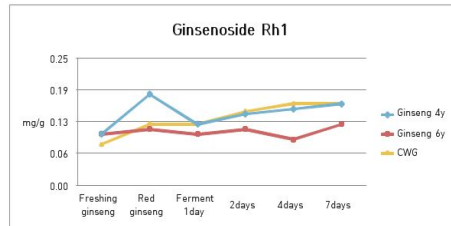


Fig. 10 Changes of ginsenoside Rh₁ contents on various ginsengs in the process of heating and fermentation.

그림 32. 발효 및 열처리의 조건에 따른 ginsenoside의 함량 변화 분석

(11) 인삼 4년근 EtOH ext. 및 EtOH ext.의 미생물 분해 및 함량분석

- 상기 연구를 보다 정확하게 수행하기 위해 발효를 통해 항암 및 암세포의 전이 억제 효과가 우수하다고 보고된 ginsenoside Rg₃와 Rh₂를 대량 함유하고 있는 산양산삼 제품을 만들기 위한 목적으로 인삼을 시료로 하여 다음과 같은 연구를 수행하였다.

(가) 인삼 4년근 EtOH ext. 및 EtOH ext.의 미생물 분해

① 인삼 4년근 EtOH ext. 제조

: 인삼 4년근 - EtOH로 환류 추출 - 여과 없이 농축 - 인삼 4년근 EtOH ext.

② 인삼 4년근 EtOH ext.에 대한 미생물 분해: 인삼 4년근 EtOH ext(70%) + 배지 (30%) - 미생물 분해(3일 배양)

③ 사포닌 제조방법

Control인 인삼 4년근 EtOH ext.와 미생물 분해물[시료(1), Lacto(2)]에 대해 기존의 사포닌 제조방법에 의해 사포닌 제조(*n*-BuOH ext.) 및 HPLC 분석

(나) 사포닌 제조에 사용된 4년근 인삼 EtOH ext. 분말 및 배양 인삼의 시료량 및 추출량(시료 - 1, 2, 3)

Sample	시료량(g)	MeOH ext.(g)	수포화 <i>n</i> -BuOH ext.(g)
4년근 인삼 EtOH ext.	3.00	1.27	0.185
배양 인삼-1(C-1)	3.48 (4.97 X 0.7)	1.98	0.132
배양 인삼-2(C-2)	3.41 (4.87 X 0.7)	1.89	0.181

(다) 수율(%)

Sample	시료량(g)	MeOH ext.(%)	수포화 <i>n</i> -BuOH ext.(%)
4년근 인삼 EtOH ext.	3.00	42.3	6.2
배양 인삼-1(C-1)	3.48	56.9	3.8
배양 인삼-2(C-2)	3.41	55.4	5.3

(라) 4년근 인삼 분말 및 배양 인삼에 있어서 10종 ginsenoside의 함량(mg/g)

Sample	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf	Rg ₁	Rg ₃	Rh ₁	Rh ₂
4년근 인삼 EtOH ext. 분말	2.65	2.99	3.12	1.41	2.14	0.85	1.74	0.01	0.07	-
배양 인삼-1(C-1)	0.97	0.98	0.20	1.24	0.84	0.67	0.60	2.52	0.29	-
배양 인삼-2(C-2)	1.08	1.20	0.93	0.79	1.02	0.78	0.67	3.50	0.32	-

- C-1 : (S)-Rg₃ - 0.657 + (R)-Rg₃ - 1.858 = 2.515 mg/g

- G-Rh₂는 생성 안됨, G-Rg₃는 250배 증가, G-Rh₁는 4배 증가(Rb₁, Rb₂, Rc 분해 큼)

- C-2 : (S)-Rg₃ - 1.065 + (R)-Rg₃ - 2.436 = 3.501 mg/g

- G-Rh₂는 생성 안됨, G-Rg₃는 350배 증가, G-Rh₁는 4.6배 증가(Rb₁, Rb₂, Rc, Rd분해)

이상과 같이 특이의 유산균 균주를 이용하여 인삼을 발효한 결과 ginsenoside Rg₃는 250-300 가량 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만 본 연구의 목표 중의 하나인 ginsenoside Rh₂가 생성 되지 않아 이에 대한 특이 균주의 확보와 적절한 환경 설정은 향후 더 연구가 진행되어야 할 것으로 판단되었다(그림 33-36).

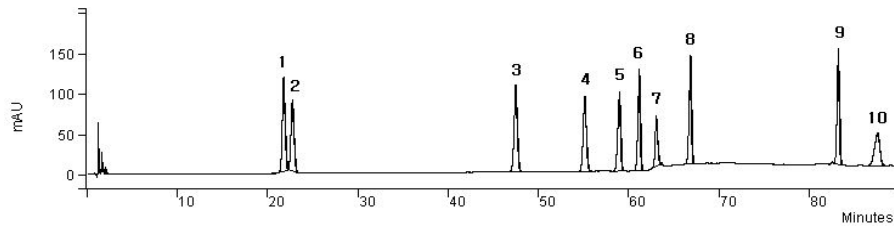


그림 33. 10종 표준품의 HPLC chromatogram

1: ginsenoside Rg₁, 2: ginsenoside Re, 3: ginsenoside Rf, 4: ginsenoside Rh₁, 5: ginsenoside Rb₁, 6: ginsenoside Rc, 7: ginsenoside Rb₂, 8: ginsenoside Rd, 9: ginsenoside Rg₃, 10: ginsenoside Rh₂

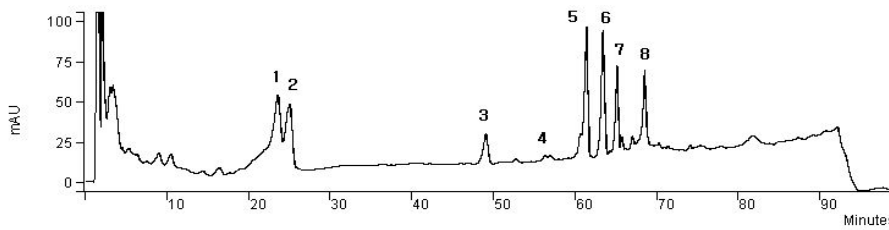


그림 34. 인삼 4년근 EtOH ext.(추출 후 여과 없이 농축)

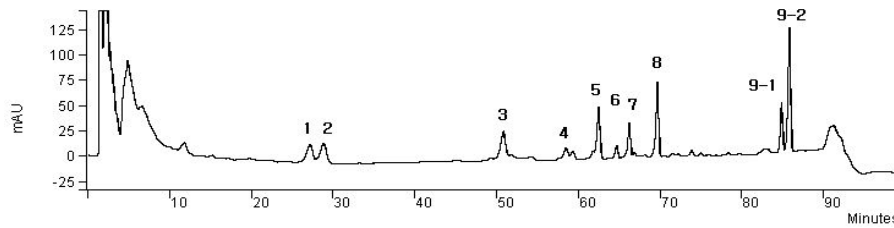


그림 35. 인삼 4년근 EtOH ext.화(추출 후 여과 없이 농축) 후 배양-1(C-1)

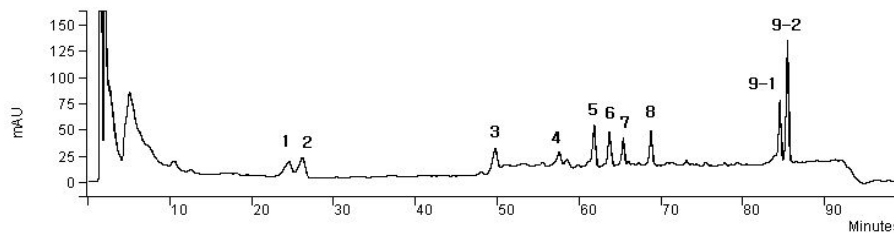


그림 36. 인삼 4년근 EtOH ext.화(추출 후 여과 없이 농축) 후 배양-2(C-2)

다. 산 및 효소를 이용한 연구결과

나. 인삼의 산첨가 가열 처리와 효소 반응을 이용한 인삼의 개발 및 ginsenoside 전환

(1) 산첨가 인삼 분산액의 가열처리

- 젓산을 첨가하여 pH를 5, 4.5, 4, 및 3.5로 조절한 후 121°C에서 15분간 가열처리한 인삼 분산액 내 ginsenosides의 변화를 TLC (Fig 1)와 HPLC (Table 1)로 분석하여 조사하였다. 젓산을 첨가하지 않고 가열한 인삼은 열처리하지 않은 인삼과 유사한 ginsenosides 조성을 보였으며 TLC에서 상호 유사하였다. 산을 첨가하지 않은 인삼 분산액의 pH는 5.87 이었다.
- 젓산을 첨가하여 pH가 낮아짐에 따라 열처리 후에 인삼의 Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, 및 Rd가 감소하였으며 Rf, Rh1, Rg3(S), Rg3(R), 및 Compound K이 증가하였다 (그림 37, 표 1).

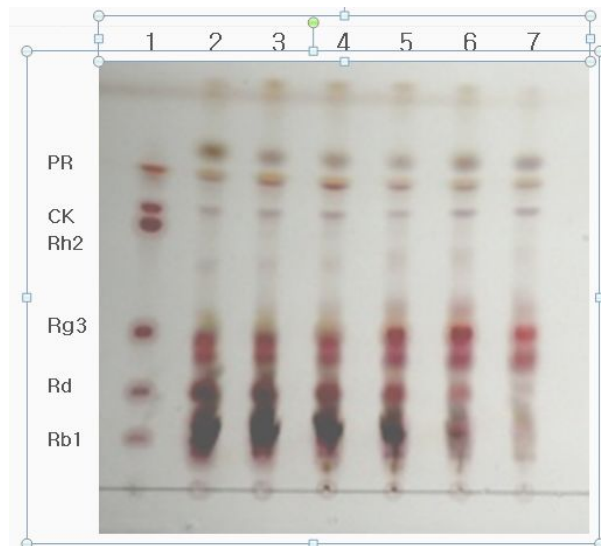


그림 37. 젓산첨가가열 인삼 분산액의 ginsenosides의 TLC 분석. 1. 표준 ginsenoside; 2. 인삼; 3. 젓산 무첨가 가열처리 인삼; 4~7. 젓산을 첨가하여 pH 5.5, 5.0, 4.5, 및 3.5으로 조절한 후 가열처리한 인삼, PR. Protopanaxadiol; CK. Compound K

표 1. 젓산첨가가열 인삼 분산액의 ginsenosides의 HPLC 분석.

Ginsenosides	Control	Heated no acid	Heated pH 5.0	Heated pH 4.5	Heated pH 4.0	Heated pH 3.5	Ginsenosides 함량 (%)						
Rg1	0.062	0.054	0.046	0.032	0	—							
Re	0.385	0.350	0.285	0.201	0.141	—							
Rf	—	—	—	0.030	0.031	0.058							
Rh1	—	—	—	0.030	0.048	0.098							
Rb1	0.221	0.240	0.178	0.104	0.091	0.082							
Rc	0.172	0.189	0.136	0.082	0.046	—							
Rb2	0.091	0.104	0.074	0.046	0.030	—							
F1	—	—	—	—	—	0.027							
Rd	0.070	0.070	0.054	0.036	—	—							
Rg3(S)	—	—	0.033	0.078	0.107	0.135							
Rg3(R)	—	—	0.026	0.062	0.088	0.126							
CK	—	—	—	0.062	0.071	0.098							
PR	0.215	0.259	0.303	0.132	0.305	0.395							

CK; Compound K

PR: Protopanaxadiol

—: Not detectable

(2) 인삼 ginsenosides 표준물의 효소 반응

— 0.06% ginsenosides와 0.4% 효소를 0.04 M 인산염 또는 초산염, 18% ethyl alcohol 수용액에서 1 용해하여 37°C에서 반응시킨 후 TLC로 분석하였다.



그림 38. Ginsenosides Rb1 (1~3), Rb2 (4~6), Rc (8~10) and Rg (11~13)의 β -galactosidase FC30에 의한 전환. 1, 4, 8, 12. 6 시간; 2, 4, 9, 12. 24 시간; 3, 6, 10, 13. 72 시간.

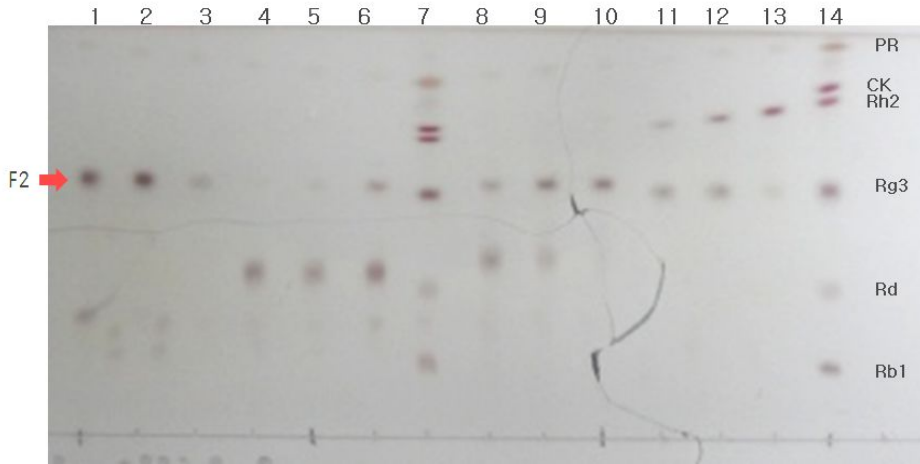


그림 39. Ginsenosides Rb1 (1~3), Rb2 (4~6), Rc (8~10) and Rg (11~13)의 β -glycosidase에 의한 전환. 1, 4, 8, 12. 6 시간; 2, 4, 9, 12. 24 시간; 3, 6, 10, 13. 72 시간.

- β -Galactosidase FC30은 Ginsenoside Rb1, Rb2, 및 Rc를 Rd, Rg3, compound K 및 protopanaxadiol로 전환하였다. Rg3에는 변화가 없었다 (그림 38).
- β -Glycosidase는 Ginsenoside Rb1, Rb2, 및 Rc를 최종적으로 ginsenoside F2로 전환하였으며 이에 중간산물이 생성되었다. Rg3를 Rh2로 전환하였다 (그림 39).

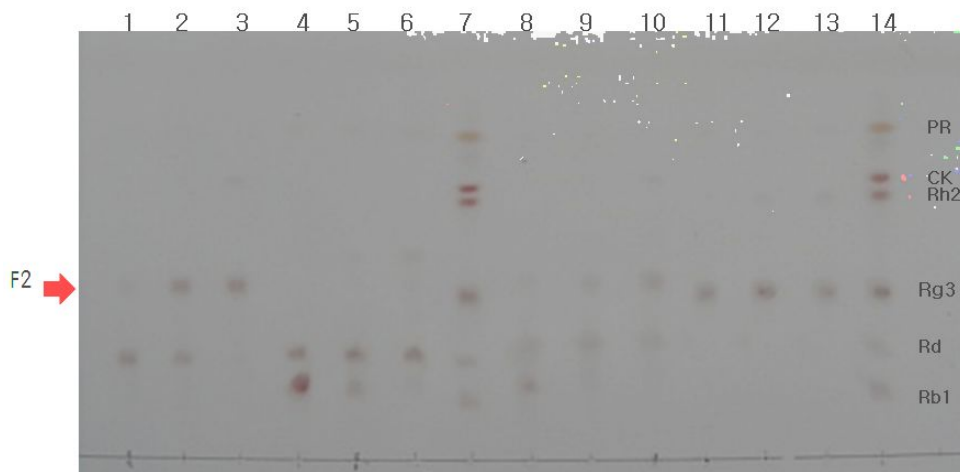


그림 40. Ginsenosides Rb1 (1~3), Rb2 (4~6), Rc (8~10) and Rg (11~13)의 viscozyme에 의한 전환. 1, 4, 8, 12. 6 시간; 2, 4, 9, 12. 24 시간; 3, 6, 10, 13. 72 시간.

- Viscozyme은 ginsenoside Rb1, Rb2, 및 Rc를 최종적으로 ginsenoside F2로 전환하였으며 이에

중간산물로서 Rd 등이 생성되었다. Rg3에는 변화가 없었다 (그림 40).

- Pectinase는 ginsenoside Rb1 및 Rc를 최종적으로 compound K로 전환하였으며 이에 중간산물로서 Rd 등이 생성되었으며 Rb2는 2 종류의 ginsenosides로 전환되었다. Rg3는 Rh2와 protopanaxadiol으로 서서히 전환하였다 (그림 41).

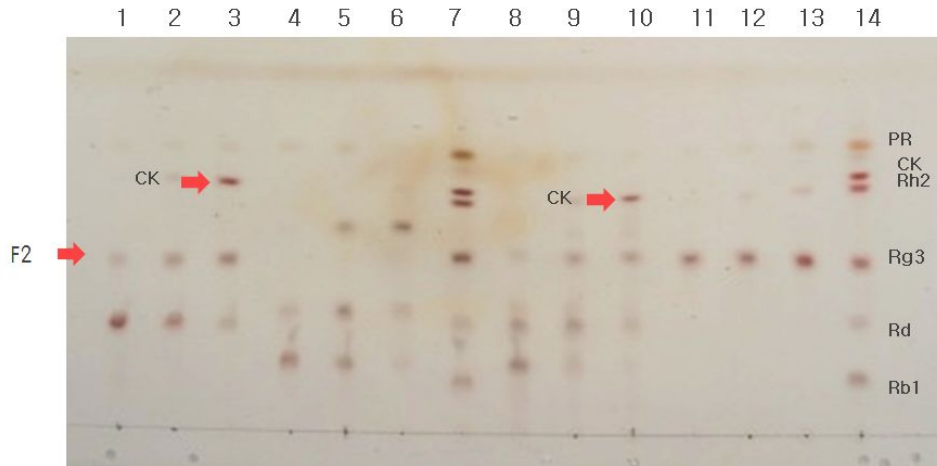


그림 41. Ginsenosides Rb1 (1~3), Rb2 (4~6), Rc (8~10) and Rg (11~13)의 pectinase에 의한 전환. 1, 4, 8, 12. 6 시간; 2, 4, 9, 12. 24 시간; 3, 6, 10, 13. 72 시간.

(3) 산첨가열처리인삼 분산액의 β -glycosidase 효소 처리

- 인삼 분산액(5g/250ml)에 젓산을 가하여 pH 4.0로 조절한 후 121°C에서 15분간 가열처리하였다. 열처리한 인삼분산액을 pH 4.5로 조절한 후 100mg의 β -glycosidase를 첨가하고 45°C에서 6, 12, 24, 및 48 시간 반응시킨 후 butanol 추출 및 농축건조한 후 methanol에 용해하여 TLC 분석하였다.
- β -Glycosidase의 반응시간이 길어짐에 따라 Rg3가 감소하였으며 Rh2가 증가하였다 (그림 42).
- 이상의 결과에서 인삼에 산을 가하여 pH 4.0-3.5 조절한 후 121°C에서 가열한 후 pH 4.5에서 β -glycosidase로 효소반응하면 ginsenoside Rh2와 compound K가 다량 함유된 인삼 제품을 생산할 수 있을 수 있었다.

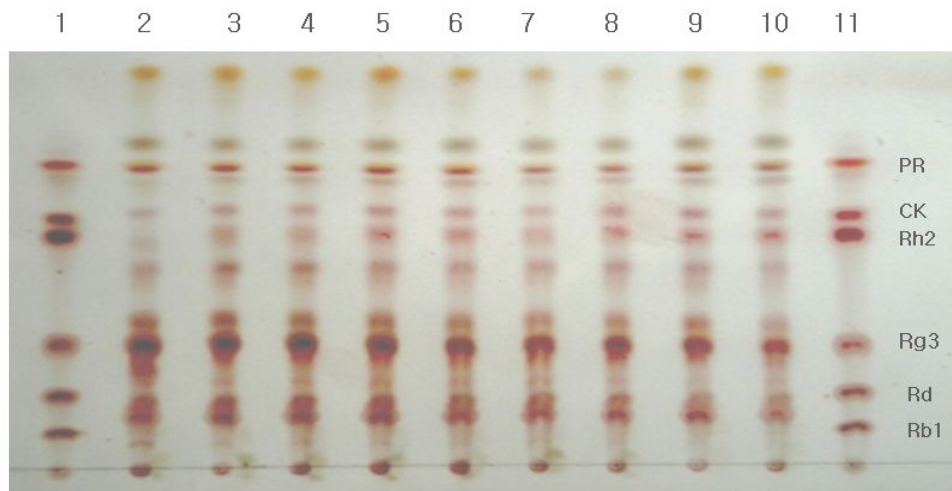


그림 42. 젓산첨가열처리 인삼의 β -glycosidase 효소 반응에 의한 ginsenosides의 전환. 표준 ginsenosides; 2, no enzyme treatment; 3. 37°C 6 hr; 4. 37°C 12 hr; 5. 37°C 24 hr; 6. 37°C 48 hr; 7. 45°C 6 hr; 8. 45°C 12 hr; 9. 45°C 24 hr; 10. 45°C 48 hr; 11. 표준 ginsenosides.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야의 기여도

1 절. 연차별 목표달성도

1. 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008)	산양산삼 가공제품개발 및 효능평가	산양산삼의 홍산삼화 제형개발을 위한 환경 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> • 우수 유전자원의 확보 • 제형 개발을 위한 원료 확보
		홍삼제조 환경에 따른 산양삼 변화추적	100	<ul style="list-style-type: none"> • 홍삼화와 발효 공정을 접목한 시제품 개발 • 시제품 개발에 따른 수종의 ginsenosides 함량의 추적
	산양산삼의 유전적 감별기술 개발	자료수집 및 유전자 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> • 표준화를 위하여 약 20여 샘플에 대한 유전자 확보
		SSH법을 통한 유전자탐색	150	<ul style="list-style-type: none"> • 산삼의 특이 유전자인 pNRT2 신규 유전자의 확보 • 산삼의 특이 유전자인 pGAPDH-w 신규 유전자의 확보
	산양산삼 가공제품의 분석 및 평가방법 개발	인삼과 산양삼, 그리고 자연산 산삼에 대한 분석을 통한 ginsenosides 함량의 추적	90	<ul style="list-style-type: none"> • 수십여 종에 달하는 샘플에 대한 분석 시료 확보 및 이들의 ginsenosides 함량의 추적
		인삼과 산양삼, 그리고 자연산 산삼에 대하여 홍삼화 및 발효화 공정을 가하였을 때의 변화 추적	80	<ul style="list-style-type: none"> • 수십여 종에 달하는 샘플에 대한 분석 시료 확보 및 이들의 ginsenosides 함량의 추적 중
	산양산삼 우수 유전자원에 대한 종묘확보 및 재배기술 확립	산삼의 유전적 감별 기술에 의하여 추적된 우수 유전자원의 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> • 산삼의 특이 유전자인 pNRT2와 pGAPDH-w 신규 유전자를 지낸 종자 확보
		종묘 및 재배기술 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> • 현재 우수 유전자원을 지낸 종자를 발아하여 재배 환경을 확보하고 대량생산체제를 구성 중임

* 참고 1

본 연구의 산업화와 대중화를 위해서는 산삼의 순수 유전자를 보존하고 있는 종자의 대량 확보와 이의 철저한 재배, 관리를 통하여 지속적인 번식체계를 확보하는 것이 본 과제의 성공에 중요한 역할이라고 판단하여 2008년 7월부터 우수 유전자원 탐색을 진행하였다.

선행 연구와 본 연구 과정에서 약 10 여종의 산삼 종자를 확보한 후 유전자 분석을 시행한 결과 단 1종만이 순수 유전자를 확보하고 있는 우수 유전자원으로 선정되었고, 이 유전자원은 현재 참여기업인 (주)천방농산 영농조합에서 특별 관리되어 현재 발아·성장 중에 있다(그림 33).

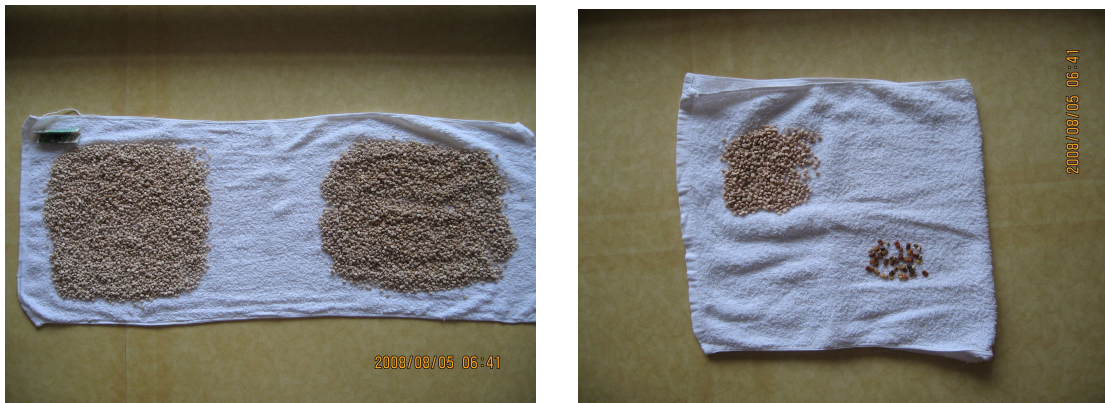


그림 33. 유전자 검사를 통해 확인된 산삼의 우수 유전자원

2. 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2009)	산양산삼 가공제품개발 및 효능평가	산양산삼의 홍삼화 및 발효를 통한 제형개발	80	산양산삼의 제품개발을 위하여 제형개발을 위한 원료를 확보한 후 선행연구 결과를 통하여 산양산삼의 효능을 극대화시키기 위하여 온도에 따른 홍삼화 과정과 유산균을 이용한 발효 공정을 다양하게 접목하여 시제품을 개발한 후 각각의 시제품에 대한 수종의 ginsenosides 함량을 추적하여 가장 우수한 환경을 찾고자 추정하고 있음.
		홍삼제조 환경에 따른 산양삼 변화추적	90	• 홍삼화와 발효 공정을 접목한 시제품 개발 후 이의 환경에 따른 수종의 ginsenosides 함량의 추적
	산양산삼의 유전적 감별기술 개발	산삼의 특이 유전자 확보	100	• 표준화를 위하여 약 20여 샘플에 대한 유전자 확보
		SSH법을 통한 유전자탐색	100	• 산삼의 특이 유전자인 pNRT와 pGAPDH-w 신규 유전자 외에 p-rpoC1, p-psbB 유전자의 확보
	산양산삼 가공제품의 분석 및 평가방법 개발	인삼과 산양삼, 그리고 자연산 산삼에 대한 분석을 통한 ginsenosides 함량의 추적	90	• 수십여 종에 달하는 샘플에 대한 분석 시료 확보 및 이들의 ginsenosides 함량의 추적
		항암 활성을 가지는 ginsenoside Rg3와 Rh2 및 compound K 등을 함유하는 기술 개발	80	• 다양한 시료 확보 및 조건에 따른 이들의 ginsenosides 함량변화를 추적하여 최적의 환경을 탐색하고 개발함
	산양산삼 우수 유전자원에 대한 종묘확보 및 재배기술 확립	산삼의 유전적 감별 기술에 의하여 추적된 우수 유전자원의 확보	100	• 산삼의 특이 유전자인 pNRT와 pGAPDH-w, p-rpoC1, p-psbB 등의 신규 유전자를 지낸 종자 확보
		종묘 및 재배기술 확보	100	• 현재 우수 유전자원을 지낸 종자를 받아하여 재배 환경을 확보하고 대량생산체제를 구성 중임

* 참고 2

본 과제의 수행에서 산삼의 특이 유전자 발굴로 선정된 우수 유전자원의 재배 환경 - 2008년에 2만주, 2009년에 10만주의 씨앗이 개입되어 천방농산 영농조합의 특정 지역에서 성장하고 있다.



그림 34. 유전자 검사를 통해 확인된 산삼의 우수 유전자원의 대량 재배 전경

* 참고 3

본 과제의 수행에서 확보된 우수 유전자원의 최적 환경을 찾기 위해 매년 유전자원의 유전자 활성화를 검사하고 있음(그림 35).



산삼감별 유전자	인삼 (5-6yr)	산양산삼1 (2yr)	산양산삼2 (2yr)	산양산삼3 (2yr)
<i>rpoC1</i>	1	2080	1830	1780
<i>pNRT2</i>	1	0.1	0.1	0.09
<i>psbB</i>	1	58.9	48.5	52.3

그림 35. 유전자 검사를 통해 확인되어 성장 중인 유삼의 분석결과

3. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2010)	산양산삼 가공제품개발 및 효능평가	산양삼의 발효와 산 , 효 소처리 등을 통한 제형개 발	80	<ul style="list-style-type: none"> 산양산삼의 항암 활성을 가지는 ginsenoside Rg3와 Rh2 및 compound K 등을 함유하는 제품 개발을 위하여 유산균 등을 이용한 발효 공정과 온도, 산의 농도, 그리고 특정 효소를 이용하여 ginsenosides 함량을 추적함. ginsenoside Rg3와 Rh2 및 compound K 등을 대량 함유하는 기술을 개발함
	산양산삼의 유전적 감별기술 개발	SSH법을 통한 유전자탐 색기술 강화	100	<ul style="list-style-type: none"> 산삼의 특이 유전자인 pNRT와 pGAPDH-w 신규 유전자 외에 p-rpoC1, p-psbB 유전자의 확보 이를 이용한 분석기술의 효율성 확보(저 비용, 신속성)
	산양산삼 가공제품의 분석 및 평가방법 개발	인삼과 산양삼 , 그리고 자연산 산삼에 대한 분석 을 통한 ginsenosides함량 의 추적	90	<ul style="list-style-type: none"> HPLC를 이용한 개발된 제품의 ginsenosides 함량의 추적 TLC를 이용하여 제품의 성분 패턴을 분석함
		항암 활성을 가지는 ginsenoside Rg3와 Rh2및 compound K 등을 함유하 는 기술 개발	80	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 시료 확보 및 조건에 따른 이들의 ginsenosides 함량변화를 추적하여 최적의 환경을 탐색.
	산양산삼 우수 유전자원에 대한 종묘확보 및 재배기술 확립	산삼의 유전적 감별 기술 에 의하여 추적된 우수 유 전자원의 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> 산삼의 특이 유전자인 pNRT와 pGAPDH-w, p-rpoC1, p-psbB 등의 신규 유전자를 지낸 종자의 지속적인 확보
종묘 및 재배기술 확보		100	<ul style="list-style-type: none"> 현재 우수 유전자원을 지낸 종자를 재배 환경을 확보하고 대량생산체제를 구성 중임 	

* 참고 3

본 과제의 수행에서 산삼의 특이 유전자 발굴로 선정된 우수 유전자원의 재배 환경 - 2008년에 2만주, 2009년에 10만주의 씨앗이 천방농산 영농조합의 특정 지역에서 순조롭게 성장하고 있다.



그림 36. 유전자 검사를 통해 확인된 산삼의 우수 유전자원의 대량 재배 전경

2 절. 관련분야의 기여도

1. 국내외 관련분야 환경변화

- 최근 5년간 산양삼의 재배환경은 약 330배가 증가하였음.
- 그러나 품질 관리기준이 없고, 또한 중국산 산양삼이 국내산으로 둔갑하여 고가에 유통, 판매되고 있어 사회적으로 많은 문제를 야기하고 있음(2009. 3. 9 - KBS 9시 뉴스 보고)
- 현재 농림수산식품부와 산림청에서는 산양삼에 대한 이력제를 시행하고자 하나 1,800여개의 생산 농가 중 14곳만 참여하고 있는 실정임.
- 본 연구진의 연구에 의하면 현재 재배되고 있는 많은 산양삼 중 대부분이 인삼의 씨앗이나 인삼의 묘삼을 산에서 재배하고 있는 것으로 분석되어 특히 사회적으로 심각한 파장이 예상됨
- 인삼과 산양삼은 모두 *Panax ginseng* C.A. May로 쉽고 빠른 시간에 간단하게 진단할 수 있는 기술이 필요한 실정임.
- 본 연구진은 이러한 상황을 예측하고 인삼과 산양삼을 감별하는 기술을 개발하고, 제대로 된 산양산삼(자연산 산삼의 씨앗이나 묘삼을 산에서 대량 재배한 삼)을 발굴하여 종자를 확대하고 국가적 경쟁 상품으로 육성하고자 하는 목적으로 수년간 연구를 진행하여 왔음.
- 현재 한국의 인삼이 세계의 삼 시장에서 차지하고 있는 비율이 점차 떨어지고 있는데 이러한 근본적인 문제를 해결할 수 있는 대안을 본 연구진은 잔류농약이나 중금속의 위험이 없으면서 우수한 효능을 발휘하는 산양산삼의 대량 재배에서 찾고 있음.
- 현재 이를 위한 가장 핵심적인 기술인 산삼의 특이유전자 발굴이 거의 개발되었거나 검증 절차를 진행하고 있고, 이러한 연구 결과를 바탕으로 우수한 효능을 지닌 한국 고유의 삼(산삼)의 우수 유전자원 확보와 효능의 극대화를 이룰 수 있는 대량 재배 기술을 확보하고자 함.
- 본 연구진은 본 과제에서 성공적으로 연구를 수행하고 있고, 이를 바탕으로 면역기능과 항암효능을 지닌 산삼 제품을 개발하고자 연구에 박차를 가하고 있음.
- 현재 면역 기능 강화 제품과 항암시장은 날로 성장하고 있고, 이에 대하여 한국 삼(Korean ginseng)의 우수성과 고유의 기술을 바탕으로 한 시장 개척이 가능하리라 판단하고 있음.
- 이러한 연구 성과는 향후 다양한 기관 등에 기술 이전을 하거나 자체 브랜드화를 통하여 농촌 경제와 국가 경쟁력 강화, 국민 또는 세계인들의 건강 증진, 한국 삼의 우수성 홍보, 대한민국의 브랜드가치 향상 그리고 현재 천안함 사태로 촉발되는 남북의 긴장과 이로 인한 향후 남북한 관계의 긴장 완화 및 발전 등을 통한 북한 주민의 생활 향상 등에 소중하게 사용될 것으로 전망하고 있음.

3 절. 연구 성과

1. 산삼의 진단방법 개발

그동안 학계의 난제로 여겨졌던 산삼의 진단 방법을 특이 유전자 검색 기술로 개발하는데 성공하였음.

가. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2008	지연산 산삼 및 산양산삼에서 발현된 특이 유전자 pNRT2 및 이를 이용한 산삼의 감별 방법	권기록 장준혁	대한민국	10-2008-0135985
2009	산삼에서 발현된 신규의 특이 유전자 pGAPDH-w 및 이를 이용한 산삼의 감별방법	권기록 장준혁	대한민국	10-2009-0036125
2009	산삼에서 발현된 신규의 특이 유전자 p-rpoC1 및 이를 이용한 산삼의 감별방법	권기록 장준혁	대한민국	10-2009-0036126
2010	산삼에서 발현된 신규의 특이 유전자 p-psbB 및 이를 이용한 산삼의 감별방법	최석호 장준혁 권기록	대한민국	10-2010-0051224

2. 우수 유전자원의 확보

또한 산삼의 특이 유전자 발굴로 선정된 우수 유전자원을 확보하는데 성공하여 2008년에 2만주, 2009년에 10만주의 씨앗을 재배하는데 성공하였음.

3. 산양산삼을 이용한 산업화 기술 개발

항암 활성을 가지는 ginsenoside Rg3와 Rh2 및 compound K 등을 대량 함유하는 기술을 개발하기 위해 다양한 방법을 시도하여 연구를 진행 중에 있음. 이를 통하여 산양산삼을 원료로 한 경구용 면역 강화제 혹은 항암 보조제를 개발, 생산하고자 함.

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

1 절. 추가연구의 필요성

1. 본 연구를 통하여 다음과 같은 문제들에 대한 어느 정도의 해결 방법을 찾을 수 있었다. 하지만 본 연구보고서에서 언급하였다시피 특정 ginsenoside를 다량 함유하는 기술 개발에 있어서 어느 정도의 성과 및 기술은 확보하였지만 세계가 놀랄만한 수준에 이르기 위해서는 앞으로도 계속 연구가 수행되어야 할 것으로 예상된다.
2. 인삼이 가지고 있는 다양한 문제(잔류 농약, 중금속 오염 등)를 해결하기 위한 대안으로 산양산삼을 이용한 삼류의 재배기술 및 유전자원의 확보는 미래의 농촌에 큰 돌파구를 제시할 수 있을 것으로 판단하고 있다.
3. 본 연구를 통해 개발된 산삼의 진단기술은 현재의 문란한 산삼 시장의 유통질서 정립하는데 중요한 척도가 될 수 있을 것이며, 이를 어떻게 잘 사용할 것인가도 고민해야 할 숙제임이 분명하다.
4. 또한 산양산삼이 가지는 우수한 효능을 바탕으로 하여 전 세계의 사망률 1위인 암 치료 시장에 진입한다면 그 경제적, 산업적 파장은 매우 클 것으로 예측하고 있다. 천연물의 가장 큰 장점인 부작용을 최소화하면서 효능을 극대화하는 기술은 천연물 제약의 가장 큰 장점임이 분명하다. 따라서 특정 ginsenoside를 다량 함유하는 기술 개발을 통해 *Panax ginseng* 류의 천연물 신약 진입을 진행하는 것이 국가적으로, 장기적으로 바람직한 방향으로 추정된다.

2 절. 타 연구에의 응용

1. 본 연구의 핵심 기술 중의 하나인 특정 ginsenoside를 다량 함유하는 기술은 *Panax ginseng* 류에 공통적으로 적용되는 기술이다. 따라서 인삼에 본 연구를 접목하게 되면 기존의 홍삼이나 인삼 류의 제품이 더욱 우수한 효능을 가지게 될 가능성이 크다고 할 수 있다.
2. 또한 동일 종(*Panax ginseng* C. A. Mayer.)에서 환경이나 성장 과정에 따라 차이를 찾아 낼 수 있는 기술은 이와 유사한 다른 식물들을 감별하는 데에도 적용하면 성공할 가능성이 큼을 시사하는 것이다.

3 절. 기업화 추진방향

- 고려인삼의 명성을 바탕으로 우수한 효능과 자연 친화성의 장점을 가진 산양산삼으로 한국을 대표하는 상품이 개발될 가능성을 확인하였음.
- 홍삼 및 발효 기술을 적용한 산양산삼의 제품 개발을 통하여 국민의 보건 건강에 기여, 특히 한방의 우수자원 확보와 통합의학의 세계 주류에서 한국의학의 특징을 상징할 수 있는 대표 한약재로서의 입지를 공고히 하고자 함.
- 남북 경제협력을 위한 한국 농림의 우수 자원 및 기술 확보를 통해 북한의 넓은 삼림과 풍부한 노동력을 이용하여 생산 기지를 설립하고 이를 관리할 수 있는 기술의 이전과 보급을 통하여 상호 발전 방향 제시
- 농가의 소득 증대를 위해 한국 농촌에 고부가가치 상품의 부각을 통한 새로운 방향 제시
- 한국의 지형을 최적으로 활용할 수 있는 상품 홍보를 통한 농산업의 활로 개척
- 산양산삼 재배 농가의 난제 해소를 위해 산양산삼의 판로와 제형 개발은 재배농가의 숙원 사업임.
- 따라서 대량 보관이 간편하면서도 장기간 보존이 가능한 고부가가치 제품의 개발이 이루어져야 함.
- 세계인이 즐겨 찾을 수 있는 다양한 제형 개발과 적극적인 세계시장 개척을 통해 세계시장에서 가격 및 품질 경쟁력을 확보해야 함.
- 건강보조식품 시장은 전 세계적으로 97년 기준 650불에서 2000년 기준 1,380억불로 빠르게 성장하고 있으며, 건강보조식품 세계시장에서 우위 확보를 위해서는 인삼제품 효능의 과학적 규명, 다양한 제형의 개발, 균질화된 품질관리 시스템이 요구되는데, 이에 부응 할 수 있는 전략적 접근이 가능함.
- 이러한 문제 인식과 기술 개발을 통해 참여기업 및 위탁기업과 협조하여 기업화로 추진을 진행하고자 함.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학정보

해당사항 없음.

제 7 장. 참고문헌

1. Shin SS, Kim KC, Choi YH, Lee YT, Eom HS and Kim CS. Critic standardization and objectivity of mountain grown ginseng. *KIOM vol.5*. 2001; 107–114.
2. D. Zhang, T. Yasuda, Y. Yu, P. Zheng, T. Kawabata, Y. Ma, and S. Okada, Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation, *Free Radic Biol Med* 20 (1996) 145–150.
3. T. K. Yun, Y. S. Lee, Y. H. Lee, S. I. Kim, and H. Y. Yun, Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active compounds, *J Korean Med Sci* 16 Suppl (2001) S6–18.
4. 單書健, 神農本草經校證, 吉林科學技術出版社 p150, 1988.
5. 손창규, 윤사라. 한의계의 한국인삼 세계화 노력제고를 위한 국내외의 시장분석 연구. 대한한의학회지, 2007;28(3):100–107
6. Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H and Zhang R. *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemoth Pharmacol*. 2007; 59: 589–601.
7. LY Wu J. Inhibitory effect of 20(S)-ginsenoside Rg₃ on growth and metasis of Lewis pulmonary carcinoma. *Zhonggliu Fangzhi Yanjiu*. 2006; 33: 311–313.
8. David GP and David DK. Ginsenosides 20(S)-protopanaxadiol and Rh₂ reduce cell proliferation and increase sub-G1 cells in two cultured intestinal cell lines, Int-407 and Caco-2. *Can. J Physiol. Pharmacol*. 2004; 82: 183–190.
9. Jang, J. H. FIGC, a novel FGF-induced ubiquitin-protein ligase in gastric cancers. *FEBS Lett*, 578: 21–25, 2004.
10. Jang, J. H., Hwang, J. H., Chung, C. P., and Choung, P. H. Identification and kinetics analysis of a novel heparin-binding site (KEDK) in human tenascin-C. *J Biol Chem*, 279: 25562–25566, 2004.
11. Jang, J. H. and Chung, C. P. A novel splice variant of fibroblast growth factor receptor 2 in human leukemia HL-60 cells. *Blood Cells Mol Dis*, 29: 133–137, 2002.
12. Park S, Kim JH, Jang JH, Aberrant hypermethylation of the FGFR2 gene in human gastric cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun 15;357(4):1011–5
13. 김승환, 장명제, 이성규, 장완성, 최현희, 성종환. 인삼복용시 과산화지질과 총항산화능에 미치는 영향. 한국체육학회지. 2003; 42(3): 661–668.
14. Choi, KJ., Kim, MW., Hong, SK., Kim, DH. Effect of solvents on the yield, brown color intensity, UV absorbance, reducing and antioxidant activities of extracts from white and red ginseng. *J. Korean Agric. Chem. Soc*. 1983; 26: 8–18.

15. 이승은, 이성우, 방진기, 유영주, 성낙술. 인삼의 부위별 항산화활성. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 2004; 12(3): 237–242.
16. Hovius, R., H. Lambrechts, K. Nocolay and B. de Kruijff. Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1021: 217–226.
17. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice–Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26: 1231–1237.
18. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 2004; 37: 277–285.
19. Huang, D., B. Ou, M. Hampsch–Woodill, J. A. Flanagan and R. L. Prior. High–throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96–well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 4437–4444.
20. Singleton, V.L. and R. Orthofer. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 152–178.
21. Malterud, K.E., T.L. Farbrot, A.E. Huse and R.B. Sund. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology* 1993; 47: 77–85.
22. Stacey, N.H. and C.D. Klaassen. Inhibition of lipid peroxidation without prevention of cellular injury in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1981; 58: 8–18.
23. LeBel, C.P., H. Ischiropoulos and S.C. Bondy. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992; 5: 227–231.
24. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265–275.
25. Liu F., Ooi V.E.C. and Chang S.T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* 1997; 60:763–771.
26. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. and Aruoma O.I. The deoxyribose method:a simple "test–tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 1987; 165:215–219.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.