

과제번호20063014

분자육종을 이용한 쌀 최고식미 개발 연구

(Development of High Palatability Rices through
Molecular Breeding)

연구기간: 2006. 4. 25 ~ 2010. 4. 24

서울대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “분자유종을 이용한 쌀 최고 식미 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010년 4 월 23 일

- | | | |
|------------------------|-------------------|-----------------|
| 주관연구기관명 : 서울대학교 | 협동연구기관명 : 충북대학교 | 협동연구기관명 : 식량과학원 |
| 주관연구책임자 : 고 희 중 | 협동연구책임자 : 조 용 구 | 협동연구책임자 : 조 영 찬 |
| 세부연구책임자 : 고 희 중 | 연 구 원 : 우 선 희 | 연 구 원 : 오 명 규 |
| 연 구 원 : 지 현 소 | 연 구 원 : 손 명 무 | 연 구 원 : 이 정 희 |
| 연 구 원 : 강 문 수 | 연 구 원 : 박 진 하 | 연 구 원 : 홍 하 철 |
| 연 구 원 : Puji Lestari | 연 구 원 : 서 훈 석 | 연 구 원 : 김 연 규 |
| 연 구 원 : 최 민 선 | 연 구 원 : 홍 지 은 | 연 구 원 : 양 세 준 |
| 연 구 원 : 함 태 호 | 연 구 원 : 김 태 정 | 연 구 원 : 권 순 욱 |
| 연 구 원 : 박 일 화 | 연 구 원 : RJ Melgar | 연 구 원 : 고 세 호 |
| 연 구 원 : 조 혜 리 | 연 구 원 : 주 용 국 | 연 구 원 : 김 혜 인 |
| 연 구 원 : 황 성 | 연 구 원 : 김 범 수 | 연 구 원 : 최 임 수 |
| 연 구 원 : MD Akter Babul | 협동연구기관명 : 경북대학교 | 연 구 원 : 박 헌 준 |
| 세부연구책임자 : 서 학 수 | 협동연구책임자 : 강 미 영 | 연 구 원 : 이 점 호 |
| 연 구 원 : 김 연 정 | 연 구 원 : 김 채 은 | 연 구 원 : 전 용 희 |
| 연 구 원 : 유 송 연 | 연 구 원 : 김 주 희 | 연 구 원 : 이 정 실 |
| 연 구 원 : 최 순 호 | 연 구 원 : 곽 영 민 | 연 구 원 : 김 근 욱 |
| | 연 구 원 : 윤 미 라 | 연 구 원 : 김 경 순 |
| | 연 구 원 : 김 수 미 | 연 구 원 : 김 명 기 |
| | 연 구 원 : 손 명 진 | 연 구 원 : 김 정 주 |
| | | 연 구 원 : 정 종 민 |
| | | 연 구 원 : 윤 미 라 |
| | | 연 구 원 : 김 복 희 |
| | | 연 구 원 : 김 나 래 |
| | | 연 구 원 : 양 경 진 |

요 약 문

I. 제 목

: 분자유종을 이용한 쌀 최고식미 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

(1) 필요성

- 시장개방을 목전에 두고 있는 만큼 향후 10년 이내에 쌀산업의 경쟁력을 반드시 확보해야 하며 경쟁력을 위한 가장 시급한 과제는 최고품질(식미)화임.
- 우리나라의 고품질(양식미) 육종은 종래의 교배 및 선발 육종에 한정되어 있어서 품질을 진일보 시키는 데에는 한계가 있으며 기초연구가 대단히 미흡함. 특히 게놈해석시대에 있어서 품질과 식미를 지배하는 유전자에 대한 연구는 거의 이루어지지 못하고 있음. 우리쌀의 경쟁력 유지가 지극히 우려되는 시점에서 경쟁국들의 품질향상을 위한 기초연구 강화 노력을 좌시할 수 없으며 우리도 시급히 기초연구와 분자유종을 추진하여야 함.
- 품질(식미)을 유전자 수준에서 해석함으로써 유전자 변이를 활용하여 품질을 고급화하고, 선발 지표를 개발하는 연구는 우리쌀의 국제경쟁력을 제고하기 위하여 필수적이며 매우 시급함.

(2) 목 적

- 고품질(양식미)와 관련된 전분, 단백질, 지질 대사 관여 유전자를 발굴하여 고품질 및 양식미 쌀 개발을 위한 선발표지와 분자유종 체계를 확립함으로써,
- 분자표지 선발(MAS)을 통한 고품질(양식미) 계통을 육성하고, 유전자 변이와 형질전환을 이용한 고품질(양식미) 쌀(GMO) 계통을 개발하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구 내용	연구 범위
<제1 세부과제> 식미 선발표지 개발과 식미 증진 벼 계통 육성	- 식미 증진 후보유전자의 발굴 및 식미군 품종간 변이 분석 및 양식미 품종들간 잡종집단 양성 - 식미군과 RIL 집단의 검정을 통한 식미 유전 선발표지 개발 - 자포니카에서 탐색된 QTL, 다른 세부과제에서 동정된 식미관여 유전자와 분자표지를 비교 분석하고, MAS 이용 식미증진 계통 선발 - 식미 분자표지 확립 및 MAS을 이용한 식미증진 계통 육성

<p><제2 세부과제> 저장 단백질 조성 및 함량 조절에 의한 벼 식미 증진</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 배유 저장 단백질 조절 관련 유전자의 이용 가능성 및 저장 단백질 함량 변화 유도에 이들 유전자의 적합성 검정 - 정상적인 형질 전환체 생산과 각 유전자들에 대한 mutant가 정상적으로 분리되었는지 검증 - 형질전환체와 mutant에서 단백질 함량 및 식미 변화 유무 검정
<p><제1 협동과제> 전분대사 관련 유전자 발굴과 재조합에 의한 벼 식미증진 계통 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 전분대사 중 식미에 관여하는 후보유전자발굴 및 형질전환용 벡터제작 및 형질전환 - 식미 관련 유전자 형질전환, 유전자도입 확인 및 발현 분석 - 유전자 형질전환체 확인, 발현분석, 식미 검정 및 우량 계통 선발
<p><제2 협동과제> 벼 지질대사 및 대사산물과 식미와의 연관성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Crude lipoxygenase 분획제조와 활성도 비교 및 Non-starch lipid 분획의 저장에 따른 지질과산화물 조성 및 함량 비교 - Non-starch lipid 분획의 취반 가공 및 저장에 따른 옥타코사놀의 함량 및 성분 조성 분석 - Starch lipid 복합체의 구성 지방산 함량 과 성분 조성 분석 및 아밀로오스 중합도 비교 - 종자 lipoxygenase와 ω-3 fatty acid desaturase 전사 활성도 및 종자 내 lipoxygenase의 정량 분석과 식미와의 관련성 검토
<p><제3 협동과제> 벼 식미관련 유전자 분석을 위한 지도 작성 및 QTL 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 재조합집단 유전자지도 작성 및 재조합집단의 식미 관련 양적형질 유전자좌 분석 - 양적형질 유전자좌 고밀도 유전자지도 작성 및 연관 DNA마커 개발, QTL-NIL 계통육성을 위한 여교잡 집단 육성 - QTL-NIL 계통육성 및 계통 특성 검정과 QTL-NIL 계통간 교배를 통한 식미관련 유전자 효과 분석 및 유전자 집적 - 유망 QTL/NIL 계통 선발, 고품질 중간모본 육성과 국내 대표품종 검증을 통한 QTL 선발표지 확립

IV. 연구개발 결과

<제1 세부과제> 식미 선발표지 개발과 식미증진 벼 계통 육성

1. 자포니카 식미 평가 및 선발 표지 개발

: 식미 우수 품종을 육성하기 위해서는 육종 초기세대에서 식미를 평가하는 것이 결정적으로 중요하다. 본 과제에서는 자포니카 벼에서 식미와 연관된 DNA 마커와 다중회귀 분석법을 이용하여 품종이나 계통들의 식미를 예측하는 방법을 개발하였다. 식미와 관련이 있을 것으로 보고된 마커와 본 과제에서 새로이 개발한 *STSs*, *SNPs*, and *SSRs* 마커 등 총 30개의 마커들을 식미를 달리하는 22개의 품종에 유전자형을 검정하였다. 22개 품종에 대해서는 식미(토요식미치와 panel에 의한 식미검정)와 관련형질들을 조사하였다. 22개 품종들의 마커 유전자형을 0과 1의 binary form으로 변형시키고 식미와의 관련성에 대해 편회귀분석한 결과 그 중 18개의 마커가 식미와 유의한 관련이 있는 것으로 나타났다. 유의한 마커들을 이용하여 식미추전 회귀식을 작성하였으며, 그 때 회귀식의 결정력(R^2)은 0.99이었다. 즉 회귀

식으로 식미를 거의 완벽하게 추정할 수 있었다. 이 방법의 효용성을 검증하기 위하여 식량 과학원에서 지역적응시험에 공시된 고세대 계통들에 대하여 토요식미기를 이용한 식미분석 치와 DNA 마커를 이용한 식미추정치를 구하여 상관을 구한 결과 고도의 정의 상관을 보여 본 연구에서 개발한 회귀식은 육종 초기세대에 식미검정을 위하여 사용가능한 것으로 평가 되었다.

2. 인디카 식미 평가 및 선발 표지 개발

: 인디카 품종들에서 식미추정방법을 개발하기 위하여 인도네시아산 식미가 다양한 24개 품종을 대상으로 앞서 실증한 자포니카와 동일한 방법을 적용하였다. 인디카에 대해서는 32개의 DNA 마커를 사용하였다. 자포니카와 동일한 식미관련형질의 평가와, 분석과정을 거쳐 식미추정 다중회귀식을 작성하였으며, 그 결정력은 0.997로 매우 높았다. 이 방법 또한 식미가 우수한 인디카 벼 육성시에 초기세대부터 사용가능할 것으로 판단하였다.

3. 중국 운남 벼 품종과 한국 벼 품종의 미질비교 및 원인분석

: 같은 자포니카벼인데도 중국 운남의 품종은 우리나라 품종에 비해 식미가 현저히 낮다. 본 연구에서는 11개의 운남 대표 자포니카품종들과 9개의 한국품종들의 식미 관련형질들을 조사하여 그 차이를 분석하였다. 운남 품종들은 한국품종에 비해 식미가 유의하게 낮은 반면 단백질함량은 매우 높았다. 식미는 단백질함량 및 치반점도와는 부의 상관을, 최고점도와 breakdown 점도 및 최종점도와는 정의상관을 보였다. 다중회귀 분석 결과 $PV=139.024-(10.865 \times PC)$ 로서 식미는 eoqmn분 단백질함량에 의하여 결정되는 것으로 나타났다. 결국 운남성 품종들의 식미를 향상시키기 위해서는 단백질함량을 낮추기 위한 품종적, 재배기술적 노력을 기울여야 할 것으로 평가되었다. 식미와 관련이 있다고 보고된 DNA 마커로 품종들의 유전자형을 분석한 결과 식미와는 직접적인 연관이 없는 것으로 나타났다.

4. Sucrose synthase 3 유전자의 haplotype 분석

: 벼에서 식미와 관련이 있는 것으로 평가된 *sucrose synthase 3 (RSUS3)* 유전자의 haplotype을 평가하기 위하여 야생벼 *O. rufipogon*을 포함하는 43개 품종에 대하여 *RSUS3* 유전자의 전체 염기서열(7,733bp)을 분석하였다. promoter, exons, introns, 5'UTR 그리고 3'UTR 부분을 망라하여 SNP와 Indel을 포함하는 총 254개 부위의 염기서열 변이를 동정하였다. 이 변이를 기초로 43개 품종을 11개의 haplotype으로 구분할 수 있었다. promoter 부위에서는 *RSUS3* 유전자가 종실에서 발현시 영향할 수 있는 cis-element의 염기서열 변이를 관찰할 수 있었다. 이 유전자의 다양성 변이 패턴으로 보아 진화과정에서 방향성 있는 변이가 특히 구조유전자 부위에서 일어난 것으로 추정하였다. 그리고 진화과정에서 적어도 11개의 재조합이 일어난 것으로 판단하였다. 또한 cluster 분석을 통하여 유전자 변이 계보 발생 과정을 추정하였다.

<제2 세부과제> 저장 단백질 조성 및 함량 조절에 의한 벼 식미 증진

1. 식미는 지방, 단백질, 탄수화물 등 다양한 요인에 의해서 결정되는데 고식미의 경우 일반적으로 단백질 함량이 낮은 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구는 저장단백질의 함량을 낮추어 식미가 높은 신품종 벼를 생산하고자 하였다. 기존에 발표된 연구 결과 의하면 저장단백질인 albumin, globulin, glutelin 그리고 prolamin의 안정성이 PDI (protein disulfide isomerase), BIP (binding protein), REB (rice endosperm bZIP)에 의해서 조절되는 것으로 보고되었다. 따라서 먼저 이들 단백질의 과다발현체와 Antisense RNA와 RNAi 기법을 이용한 knock-down 형질전환체를 제조하여 저장단백질의 함량변화를 살피고 최종적으로 단백질 함량이 저하된 개체를 선발하고자 하였다. 현재 3세대에 걸쳐 선발된 형질전환체 계통을 이용하여 종자분석을 시행하고 있다. 또한 단백질체학 방법을 이용하여 고식미벼와 저식미벼의 종자에서 특이적으로 축적되는 단백질들을 동정하여 식미관련 여부를 조사하였다.
2. 선발된 15개 단백질을 대상으로 종자에서 축적되는 양상과 mRNA의 발현양상을 비교하였고 각각의 단백질들을 기능적인 측면에서 분석 및 목록화한 결과, 동정된 단백질들의 발현은 대부분 번역 후 조절과정을 거치며 그 중 대사관련 단백질들은 고식미에서 특이적으로 축적되고 저식미일수록 방어에 관여하는 단백질의 함량이 높은 것을 확인 할 수 있었다. 동정된 단백질을 코딩하는 유전자가 파괴된 T-DNA 삽입 돌연변이체를 확보하여 표현형의 변화와 종자 내 단백질의 함량을 분석하였다. PDI 돌연변이체의 경우, 간장과 분얼 수가 줄어든 것을 확인하였고 특히 종자가 비정상적인 백화현상을 보이면서 단위 무게 당 단백질 함량이 야생형에 비해 상당히 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 또한 종자 발달 과정 중 PDI 단백질의 발현 양상과 종자 내 발현 분포를 조사한 결과 PDI 단백질이 전사 후 변이 과정을 통해 안정적으로 축적되어 저장단백질의 함량 조절에 관여하고, 그 분포는 종자 내에서 거의 일정하다는 것을 확인하였다. 전자현미경을 이용한 종자 관찰에서는 탄수화물의 결정화가 불규칙해 그 결정구조가 온전히 형성되지 못한 것을 확인 하였으며 단백질 과립의 경우 돌연변이체에서 훨씬 많이 형성되었지만 쉽게 부서질 수 있는 형태로 존재함을 알 수 있었다.
3. Osprmc3 돌연변이체에 대한 분석에서는 야생형보다 크기가 작은 백악질의 종자와 간장이 작고 매우 많은 수의 분얼을 관찰할 수 있었다. 그 외의 다른 식미 관련 후보 단백질들의 돌연변이체에서도 이와 유사한 표현형을 보여, 이 단백질들이 종자 발달과 식미에 밀접한 관련이 있을 것이라 판단된다. 또한 저장 단백질들의 안정성을 조절하여 종자 단백질의 함량 조절에 관여할 것이라 예상되는 PDI, BIP, REB 단백질의 함량을 고식미와 저식미벼의 종자에서 확인하여 식미와의 상관관계를 조사하였다. 각각의 단백질들에 대한 특이적인 항체를 제작하여 실험에 사용하였고 예측과는 달리 식미와의 밀접한 관계는 보이지 않았다. 현재 다양한 분자 생물학적 방법을 이용하여 식미 관련 후보 단백질에 대한 돌연변이체의 식미검정과 그 활용가능성을 계속 탐색하고 있다. 이 연구를 통해 발굴된 유용 유전자는 앞으로 식미 관련 연구에 큰 도움을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 또한 제작된 형질전환체와 돌연변이체의 특허 출원 등을 통해 이익도 함께 창출할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

<제1 협동과제> 전분대사 관여 유전자 발굴과 재조합에 의한 벼 식미증진 계통 개발

1. 고품질 및 저품질 일본형 벼 품종의 식미도에 관련된 요소들의 분자적 특성

- (1) 전분합성에 관련된 주요 효소인 Sbe1, Sbe3, Waxy 유전자의 genomic DNA sequence level에서 고품질미 및 저품질미 벼 품종들 간의 차이점을 genomic PCR로 밴드 패턴을 분석한 결과 모든 증폭 밴드에서 고품질 및 저품질 벼 품종들 간에 차이를 보이지 않았다.
- (2) Sbe1, Sbe3 및 Waxy 유전자에서 증폭된 모든 DNA를 sequencing 하여 염기서열을 비교 분석한 결과 Sbe1 유전자는 12개의 SNP가 발견되었고 Waxy 유전자에서는 1개의 SNP만이 발견되었다.
- (3) Sbe1 유전자 염기서열에 존재하는 SNP와 InDel의 분포를 조사한 결과 고품질 벼와 저품질 벼에서 7~10, 12, 16~17, 20 및 22~24번 염기 부분에 차이가 있는 것을 분명히 알 수 있었다. 이 차이는 고품질 벼와 저품질 벼 간에 나타난 SNP의 분명한 차이로서 품질의 차이와 어느 정도 관련이 있는 것으로 생각된다.
- (4) Sbe1, Sbe3 및 Waxy 유전자의 염기서열에 존재하는 SNP와 InDel의 분포를 고품질 벼와 저품질 벼에서 조사한 결과 Sbe1 유전자는 고품질 벼에서는 SNP와 InDel이 품종간에 같았으나 저품질 벼에서는 SNP와 InDel이 품종간에 차이를 보였다. Sbe1 유전자의 DNA 염기서열의 경우에는 고품벼들의 linkage -AAAGGGTTG- 가 저품질 벼들에서는 TGGGAAAC-AT로 부분적으로 바뀌어 고품질 벼와 저품질 벼 품종들 간에 식미 품질 (palatability quality) 차이와 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 생각하였다.
- (5) Sbe3 유전자는 고품질 벼들에서는 2, 4, 6, 9번째 염기들이 linkage G--- 패턴을 보였으나, 저품질 벼들에서는 linkage G--- 가 ATTT로 부분적으로 바뀌었다.
- (6) Waxy 유전자는 고품질 벼들에서는 4, 5, 7번 염기에서 linkage AGA였으나, 저품질 벼 중에서 도봉벼는 AGA가 CGA로, 삼남벼는 AAG로 바뀌었는데 팔공벼와 신금오벼에서는 SNP와 InDel이 발견되지 않았다.
- (7) 벼의 등숙기에 개화기부터 5일 간격으로 개화 후 25일까지 고품질 벼와 저품질 벼의 미숙종자를 채취하여 semi-quantitative RT-PCR로 분석한 결과 RNA의 발현은 개화 후 10~20일에 가장 많은 발현을 보였는데, Sbe1, Sbe3, SSS1 및 SSS2A 유전자의 발현은 개화 후 10~20일에 고품질 벼들이 저품질 벼들에 비하여 발현량이 높았다.
- (8) GBSS1 유전자의 경우에는 발현시기가 비교적 중후기인 개화 후 10~20일에 가장 많은 발현을 보였고 고품질 벼들에서는 다른 유전자들에 비하여 발현량이 상대적으로 저하되었으며 저품질 벼인 삼남벼에서 다른 품종들 보다 RNA 발현량이 증가됨을 볼 수 있었다.

2. 전분가지화효소 유전자(OsSbe1)의 형질전환 발현에 의한 고식미 벼계통 개발

- (1) 벼 전분가지화효소 유전자(Sbe1)를 벼에 발현하기 위하여 2,268 bp의 Sbe1 ORF를 삽입한 p35S:OsSbe1 재조합유전자를 제작하였고 이를 고품벼에 Agrobacterium을 이용한 벼

종자 단기 형질전환방법을 사용하여 Sbe1 유전자 형질전환 벼 1,005개 계통을 육성하였다.

- (2) 벼에 도입한 Sbe1 유전자의 발현을 RNA의 발현수준에서 semi-quantitative RT-PCR로 분석한 결과 wild type인 고품벼는 아주 약한 발현을 보인데 비하여 Sbe1 유전자가 도입된 계통들은 모두 고품벼 보다 높은 RNA의 발현을 보였는데 계통에 따라서 발현에 큰 차이를 나타내었다.
- (3) Sbe1 유전자가 도입된 형질전환 벼 종실의 아밀로스 함량은 12~29% 범위의 다양한 변이를 나타내었다. 특히, 고품질미 벼의 육성에 적합하리라 예상하는 15~17% 범위에 가장 많은 빈도를 나타내어 예상했던 다양한 아밀로스 함량 변이체의 육성이 가능 할 것으로 생각되었다.
- (4) 형질전환 벼의 T2 세대의 아밀로스 함량이 low(12%), medium (18%), high(28%)를 보였던 계통들을 선택하여 T3 세대에서 출수 후 15일에 미숙종자를 채취하여 wild type인 고품벼와 함께 Sbe1, Sbe3 및 Sbe4 3종의 전분가지화 효소의 활성을 분석한 결과 T2 세대에서 전분함량이 12.57%였던 13017 계통은 고품벼 보다 5.6배, 12.32%였던 13282 계통은 고품벼의 1.9배, 13218 (18.35%)과 13145(18.04%)은 고품벼와 유사한 효소 활성을 나타내었으나, 11985-11 (28.48%)과 12101-8 (29.62%) 계통은 각각 0.52배와 0.32배로 현저히 낮았다.
- (5) Sbe1 유전자 형질전환 벼의 T2 세대에서 식미성과 관련된 여러 가지 요소들을 백미를 가지고 분석한 결과 고품벼에 비하여 쌀의 물리화학적 특성에 많은 변화가 발생한 것으로 나타났다. 특히 Toyo Taste meter 식미치는 고품벼가 70.4의 값을 나타내었는데 형질전환 벼에서는 61.1~72.6의 값을 보였으나 70.4의 고품벼의 식미치 보다 높은 계통이 6개, 비슷한 계통이 3개 계통이 선발되었다.
- (6) T2 세대에서 초형과 수량성이 우수하고 아밀로스 함량이 낮은 계통을 선발하여 T3 종자를 수확하여 아밀로스 함량, 작물학적 특성, 수량성, 식미도 등을 조사한 결과 작물학적 특성들이 우수하였으며 수량성을 살펴보면 고품벼가 현미 수량에 있어서 602.7 kg/10a 인데 비하여 선발한 엘리트 계통들은 607.9~719.0 kg/10a의 범위로서 wild type인 고품벼 보다 높은 수량성을 나타내었고, 식미도에 있어서도 고품벼가 Toyo taste value가 70.4인데 비하여 모든 선발 계통에서 70.5~72.6으로서 고품벼와 같거나 높은 우수한 식미성을 나타내어 앞으로 새로운 품종으로 개발할 수 있는 높은 가능성을 나타내었다.

3. 전분합성 관련 유전자의 형질전환 벼 개발

- (1) 전분대사 중에서 amylopectin 합성에 관련된 주요 효소인 Sbe1, AGPL2, SUS1 등 유전자의 발현을 종자의 배유에 직접적인 발현을 유도하기 위하여 배유 특이 globulin 단백질 유전자의 promoter(Glb)를 부착하여 재조합유전자를 작성하여 pMGR, pMGA, pMGS로 명명하였다.
- (2) 전분대사 중에서 amylose 합성을 촉매하는 효소인 Waxy와 SSS1 유전자의 발현억제를

유도하기 위하여 35S promoter를 유전자의 앞 부위에 부착하여 재조합 유전자를 작성하여 pCAMW-Ri, pCAMS-Ri로 명명하였다.

- (3) Agrobacterium 방법을 이용한 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 pCAMW-Ri, pMGR, pMGR/pCAMW-Ri 재조합 유전자를 벼에 도입하여 형질전환 벼를 육성하였고 HPT, Bar 등의 선발마커를 PCR 로 증폭하여 유전자의 도입을 확인하였다.
- (4) pMGA, pMGS, pCAMS-Ri 재조합 유전자를 Agrobacterium 방법을 이용한 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 벼에 형질전환 한 벼를 육성하여 온실에서 재배하여 육성 중에 있으며, T1 종자를 수확하여 2010년도에 격리포장에 이양하여 재배하여 고품질미 벼 품종 육종을 위한 교배모본으로 활용할 계획이다.

<제2 협동과제> 벼 지질대사 및 대사산물과 식미와의 연관성 분석

1. 식미에 두드러진 차이가 있는 2품종 쌀 곡립의 이화학적 특성

: 식미에 두드러진 차이가 있는 것으로 알려진 고품과 팔공 품종의 쌀 배유 이화학적 특성을 비교한 결과, 취반 식미특성에서 토요식미치 및 관능검사 성적 결과는 두 품종간 유의적인 차이가 있었다. 쌀 배유 전분지질의 경우 고품이 팔공보다 전분지질 함량과 불포화 지방산의 조성비가 높았다. 또한 식미가 우수한 고품의 경우 식물성 스테롤 조성 중 스쿠알렌과 사이클로아테놀 함량이 높았다. 총 아미노산에 대한 필수아미노산 비율은 팔공이 고품보다 높은 비율을 보였으며 필수아미노산 중 쌀의 제 1제한요소인 lysine의 조성비는 거의 비슷한 비율을 나타내었다. 호화특성 중 팽윤력은 두 품종 모두에서 쌀가루에 비해 쌀 배유에서 분리된 전분의 팽윤력이 높게 나타내었고 신속점도계 및 DSC에 의한 호화 특성에서는 식미가 좋은 고품이 팔공보다 호화온도 및 호화엔탈피가 낮았다. 전분의 결정화도를 나타내는 X-선 회절 양상에서는 두 전분의 결정강도의 차이는 크지 않았고 전분 입자의 glucoamylase에 의한 경시적인 가수분해도 비교에서는 팔공이 고품보다 높게 나타내었다.

2. 식미에 차이를 보이는 7품종 쌀 배유 지용성 성분 및 호화특성

: 취반 특성 밥의 윤기로부터 식미치를 제시해주는 토요식미치는 삼광 > 고품 > 추청 > 일품 > 팔공 > 삼남 > 도봉 순으로 품종 간의 유의적인 차이를 확인할 수 있었다. 식미가 우수한 품종일수록 아밀로오스와 복합체를 형성하고 있는 전분지질 지방산 조성비에서 linoleic acid 및 linolenic acid 조성이 높은 비율을 나타내는 경향이였다. 품종 간 아밀로오스 함량 및 쇄장 길이 분포에서 차이를 나타내었으나 식미와의 연관성은 확인되지 않았다. 호화특성에는 식미가 중간정도에 해당하는 일품이 쌀가루 호화온도가 낮았고 식미치가 가장 낮은 값을 보인 도봉은 전분 호화개시온도 및 호화엔탈피가 가장 높았다. 식미치가 낮았던 도봉 쌀가루와 전분 팽윤력이 65℃ 수화초기에서 다른 품종에 비해 두드러지게 낮았다. 비전분(유리) 지질 지방산 조성에서 7품종 모두 oleic acid와 linoleic acid의 함량 조성이 높았다. 지질의 가수분해 효소인 lipase 및 지방산 산화 환원 효소인 lipoxigenase

모두 식미치가 낮은 품종일수록 그 활성이 큰 것을 알 수 있었다. 식미가 우수한 품종의 경우 조성 함량이 높은 식물성 스테롤류로는 squalene과 cycloartenol이었고 대표적인 식물성 스테롤류인 campesterol, stigmasterol, sitosterol 등의 함량은 식미에 상관없이 품종 간 차이를 나타내었다. 아미노산 조성비에서는 glutamic acid 함량이 높은 품종들이 식미치가 높은 경향이었다.

3. 식미에 차이를 보이는 12품종 쌀 배유 성분 특성 검정

: 고식미, 중식미, 저식미로 식미에 차이를 나타내는 12 품종 쌀의 토요식미기기에 의한 식미치(Toyo-value) 결과는 고시히까리 > 삼광 > 고품 > 추청 > 화성 > 동진 > 일품 > 화청 > 팔공 > 삼남 > 신금오 > 도봉의 순으로 유의적인 차이를 보였다. 취반 후 물성 측정 결과는 식미가 우수한 품종인 고품과 삼광이 각각 경도(hardness) 및 부착성(adhesiveness)에서 높은 값을 나타내어 씹힘성이 있는 조직감을 가지고 있음을 알 수 있었다. 쌀 배유 비전분 유리지질 지방산 조성 중 linoleic acid에서 저식미치를 나타낸 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 품종이 낮은 조성비를 나타내는 경향을 보였다. 전분지질 지방산 조성에서는 palmitic acid의 조성비가 가장 높은 비율을 나타내었고 식미와 연관성이 기대되는 linolenic acid 조성비의 경우, 식미가 우수하거나 중간정도 식미치를 나타낸 품종이 저식미치 품종 보다 높은 함량비율을 나타내었다. 식물성 스테롤인 squalene, cycloartenol 함량은 식미가 우수하거나 중간정도 식미치를 나타낸 품종들이 높은 함량을 나타내었다. 전분의 팽윤력은 쌀가루에 비해 높게 나타내었고 품종 간 유의적인 차이를 보였다. 전분 95℃ 팽윤력에서 식미치가 가장 높은 고시히까리 품종이 가장 높게 나타내었다. RVA 및 DSC에 의한 쌀가루 및 전분의 호화특성에서 식미치가 다른 12품종 간에 유의적인 차이를 나타내었고 저식미치를 보인 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 품종은 식미가 우수하거나 중간 식미치를 가진 품종에 비해 높은 호화온도 분포를 나타내어 이들 호화온도의 차이가 식미치를 어느 정도 반영하는 것으로 보인다. 식미가 우수할수록 단백질 함량은 낮은 경향을 나타내었고 미량원소 Mg/K 함량 비율은 식미가 우수한 고시히까리가 가장 높은 비율을 보였다. 12 품종에 대한 식미와 배유 성분 특성간의 상관관계에서 전분 지질 구성 linoleic acid 조성비는 식미치와 정의 상관성을 나타내었다.

4. 저장에 따른 쌀 배유 지용성 성분 및 호화특성 변화

: 식미에 차이가 있는 7품종 쌀의 3개월 저장에 따른 변화를 살펴본 결과, 쌀 배유 비전분 유리지질의 지방산 조성 변화에서는 palmitoleic, oleic acid는 증가하는 경향을, linoleic acid는 감소하는 경향을 나타내었다. 전분지질의 지방산 조성 변화에서는 모든 품종에서 palmitic acid는 증가하는 양상을 보였다. 식물성 스테롤인 squalene, sitosterol, campesterol은 저장에 따라 모든 품종에서 증가하는 경향을 나타내었다. RVA 호화특성은 저장에 따라 모든 품종에서 최고, 최저, 최종점도가 유의적으로 증가함을 보였고 전분의 DSC 변화는 호화개시, 피크, 종결온도는 큰 변화를 보이지 않았으나 호화엔탈피에서

는 식미가 우수한 삼광이 유의적으로 증가하였다. 저장에 따른 식미치의 변화에서도 모든 품종에서 유의적으로 감소하고 있었다.

<제3 협동과제> 벼 식미관련 유전자 분석을 위한 지도 작성 및 QTL 분석

1. 수원365호/추청벼 재조합집단의 연관지도는 모본간 다형성을 보인 320개 마커(29.2%) 중 188개 SSR 마커를 이용하여 작성하였고, 연관지도의 12개 염색체 전체 길이는 1,902cM이고 마커간 평균거리는 10.1cM이었다.
2. 수원365호/추청벼 재조합집단에 대한 식미관련 형질 알카리 붕괴도, 아밀로스 함량, 단백질 함량, 밥의 윤기치 등을 분석하여 상관관계를 분석한 결과, 식미 값은 알카리 붕괴도, 아밀로스 함량, 출수기와 정의 상관을 보였고, 단백질 함량과는 고도의 유의한 부의 상관을 보였다. 특히, 밥 윤기치와 전체 식미값은 고도의 유의한 정의 상관을 보였고($r=0.49-0.51$), 전체 식미값과 밥맛 또한 고도의 유의한 정의상관을 보였다 ($r=0.90$). 알카리붕괴도, 아밀로스함량, 단백질함량, 밥 윤기치에 대한 18개 QTL과 관능검사에 의한 밥맛과 전체 식미치에 관련하는 2개의 QTL을 동정하였다. *qAC8*은 연차간 연속적으로 탐색된 major QTL로써, 전체 표현형 변이의 21%-30%를 포함하였다. *qPCI*는 4년 동안 연속적으로 환경변이와 관계없이 탐색되었고, 밥 윤기치와 관련된 QTL, *qGCR6.1*, *qGCR7*, *qGCR8* 또한 연차간 연속적으로 탐색되었다. 특히 *ix* locus를 포함하는 6번 염색체의 *qGCR6.1*은 수원365호의 allele가 밥 윤기치를 향상시키는 부위로서 추청벼의 윤기치 개선에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다. 여교배 집단 후대에서 *qGCR7*과 *qGCR8*의 allele 효과는 각각 2.35, 2.25로 나타났으며, 앞으로 이들 QTL 집적 계통을 육성하고, 환경반응을 분석함으로써 식미 개선 및 고품질 벼 품종 육성에 기여할 것으로 기대하고 있다.
3. 일품벼/Moroberekan 재조합집단에 대한 식미관련 형질 알카리 붕괴도, 아밀로스 함량, 밥의 윤기치, 패널의 식미치 평가 등에 대한 상관관계를 분석한 결과, 밥의 윤기치(GCR)는 패널의 식미평가에 의한 윤기, 맛, 질감, 총평 등과 고도의 유의한 정의 상관을 보였다. 알카리 붕괴도, 아밀로스함량, 밥 윤기치에 대한 16개 QTL과 관능검사에 의한 밥맛과 전체 식미치에 관련하는 17개의 QTL을 확인하였다. QTL들 중 3번, 5번 및 6번 염색체 상의 QTLs가 자포니카 식미에 큰 영향을 미치는 major QTL로 추정되며, 3번 염색체상의 *qEQ3*은 AC, GCR, GL, ST, HA 및 OE 관련 QTLs 함께 위치하였으며, 추청벼의 식미관련 QTL는 탐색되지 않았고, Koshihikari의 식미관련 QTL가 탐색된 좌위이다. 5번 염색체상의 RM5558~RM5642 좌위의 *qEQ5*는 패널의 식미평가에 의한 GL, ST, HA 및 OE 관련 QTL들만 좌위하고, 추청벼, Koshihikari에서는 탐색되지 않은 일품벼 고유 allele에 의한 것으로 생각된다. 6번 염색체상의 RM540~RM253 QTL 좌위의 *qEQ6.1*은 ADV, AC, GCR, GL, ST, HA 및 OE 관련 QTL들이 cluster되었고, 이 좌위는 자포니카의 밥맛에 매우 중요한 영향을 미치는 Waxy 유전자와 *alk* 유전자가 위치하며, 수원365호/추청벼 RIL 집단 분석에서 *qEQ6.1* 좌위는 수원365호 allele이 GCR을 증가시키고, Koshihikari allele도 이 좌위에서 식미치와 관련

된 QTL을 보유하는 것으로 나타났다.

4. 수원365호/추청벼 및 일품벼/Moroberekan 재조합 집단에서 추청벼 및 일품벼 allele에 의한 식미관련 QTLs를 식미치가 낮은 팔공벼에 도입하여 그 효과를 분석한 결과, 추청벼의 GCR 관련 QTLs *qGCR7* 및 *qGCR8*을 보유한 RIL 계통을 팔공벼와 교잡하여 육성한 BC₁F₃ 계통에 대한 GCR 검정에서 모든 계통은 팔공벼의 GCR 64.5보다 높은 값을 가져, 식미치가 개선되는 효과를 가지는 것으로 나타났다. 일품벼의 식미관련 QTL를 팔공벼에 도입한 경우, 팔공벼의 GCR 값 보다 높았으며, 식미평가 총평 값도 증진되는 것으로 나타났다.
5. 수원365호/추청벼 조합 RIL 계통들 중에 농업형질과 식미치 등이 양호한 계통 SR23577 F₁₄-31-1-B를 선발하여 '수원536호'로 명명하였다. '수원536호'는 출수기가 8월19일인 중만생종으로 도열병과 줄무늬잎마름병에 저항성이며, 쌀수량은 584kg/10a로 2010년부터 지역적응시험에 공시할 예정이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과 총괄표

기술거래	사업화	교육·지도활용	정책활용	타연구에 활용 및 2단계연구에 활용	기타 활용
건	건	건	건	3 건	건
특허	논문	학술대회 발표	홍보실적	전시회 참가	기타 홍보
2 건 (국내 : 2 건) (국외 : 건)	21 건 (국내 : 13건) (국외 : 8 건)	48 건 (국내 : 31 건) (국외 : 17 건)	건 (국내 : 건) (국외 : 건)	건 (국내 : 건) (국외 : 건)	1 건

* 인력양성: 석박사과정 2명, 박사: 2명 배출

2. 성과 활용 계획

(1) 분자표지 활용

- 최고식미 육종 연구 또는 사업에 직접 이용: 식량과학원을 비롯한 국공립 연구기관 또는 개인육종가들의 벼 식미육종시 효율화를 기할 수 있어 우리쌀의 경쟁력 제고
- 추후 분자표지 특허의 산업화를 통한 바이오 산업 발전에 기여
- 분자표지 중 유전자가 밝혀지지 않은 표지는 후속연구에 활용

(2) 형질전환체 활용

- 단백질 변이체, 전분유전자 변이체를 추후 식미 개선을 위한 연구재료로 활용

(3) 논문 추가 발표

- 아직 발표하지 못한 자료들은 정리 분석하여 논문(SCI 및 국내)으로 발표함으로써 식미연구의 기초 정보 제공

SUMMARY

(영문 요약문)

<Sub-project 1> Development of DNA markers associated with cooked rice taste and breeding high-palatability lines

1. PCR marker-based evaluation of the eating quality of japonica rice

: Evaluation of eating quality in early breeding generations of rice is critical to developing varieties with better palatability. Here, we report DNA markers associated with eating quality of temperate japonica rice and develop an evaluation method aided by multiple regression analysis. A total of 30 markers comprising STSs, SNPs, and SSRs were tested for their association with palatability using 22 temperate japonica varieties with different palatability values. Eating quality-related traits of the 22 varieties were also measured. Of the 30 markers, 18 were found to be significantly associated with palatability, and consequently, a model regression equation with an R^2 value of 0.99 was formulated to estimate the palatability by the marker data set. Validation of the model equation using selected breeding lines indicated that the marker set and the equation are highly applicable to evaluation of the palatability of cooked rice in temperate japonica varieties.

2. Development of PCR marker-based evaluation of the eating quality in indica rice

: To develop the prediction method of cooked rice taste in indica rice, we adopted the same procedure as in japonica rice using 24 indica rice varieties harvested in Indonesia. For indica rice 32 DNA markers were tested. Using the same procedure including genotyping with PCR markers and regression analysis, we made a multiple regression equation suitable for the prediction of cooked rice taste in indica rice, which displayed a significant determinability, $R^2=0.997$. The marker set and the equation are highly applicable to evaluation of the palatability of cooked rice in indica varieties.

3. Comparison of grain quality traits between japonica rice cultivars from Korea and Yunnan province of China

: Improving eating quality is one of the most important objectives in japonica rice breeding programs in Yunnan Province of China. Eating quality and its relevant traits of nine Korean and 11 Yunnan rice cultivars were comparatively analyzed in this study. The grain shape of most Yunnan japonica rice cultivars have a relatively slender shape and are slightly larger than Korean rice cultivars. Palatability value of cooked rice of

Yunnan rice cultivars was significantly lower, while the protein content of Yunnan rice cultivars was significantly higher than that of Korean cultivars. Peak viscosity and breakdown viscosity of the Yunnan rice cultivars were significantly lower, while setback viscosity of the Yunnan rice cultivars was significantly higher than in Korean rice cultivars. Palatability value of cooked rice was negatively correlated with protein content and setback viscosity but positively correlated with peak viscosity, breakdown viscosity, and cool paste viscosity. Through multiple linear regression analysis, an equation for estimating palatability value (PV) of cooked rice based on quality traits was generated as dependent only upon protein content (PC), $PV=139.024-(10.865 \times PC)$ with an R² value of 0.822. The results suggest that reducing protein contents should be the major target in improving eating quality of Yunnan japonica rice cultivars through integrated approaches of both cultivar development and appropriate cultural practices. Genetic similarities among cultivars based on DNA markers which had been identified as associated with grain quality seemed not to be directly related to PV.

4. Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotype Diversity in Rice *Sucrose Synthase 3*

: Rice *sucrose synthase 3* (*RSUS3*) is expressed predominantly in rice seed endosperm and is thought to play an important role in starch filling during the milky stage of rice seed ripening. Because the genetic diversity of this locus is not yet known, the full sequence of *RSUS3* from 43 rice varieties was amplified to examine the distribution of DNA polymorphisms. A total of 254 sequence variants, including SNPs and indels, were successfully identified in the 7,733 bp sequence that comprises the promoter, exons and introns, and 3' downstream non-transcribed region (NTR). Eleven haplotypes were distinguished among the 43 rice varieties based on nucleotide variation in the three defined regions (5'NTR, transcript and 3'NTR). The promoter region showed evidence of a base change on a cis-element that might influence the functional role of the motif in seed-specific expression. The genetic diversity of the *RSUS3* gene sequences in the rice germplasm used in this study appears to be the result of non-random processes. Analysis of polymorphism sites indicated that at least eleven recombinations have occurred, primarily in the transcribed region. This finding provides insight into the development of a cladistic approach for establishing future genetic association studies of the *RSUS3* locus.

<Sub-project 2> Improvement of rice quality through regulation of the amount of endosperm-specific proteins

1. Second topic of this project is aimed on isolation and production of high eating quality mutant and transgenic rice by lowering amount of seed storage protein using molecular biochemistry methods. It has been known that protein disulfide isomerase (PDI), binding protein (BIP) and rice endosperm bZIP (REB) are involved in the regulation of stability of seed storage proteins.
2. We first isolated knock-out rice mutants of genes encoding the proteins and produced their-overexpressing rice plants, and examined their phenotypes to check the possibility of application of the genes for the improvement of the traits such as color and size of the seeds. Knock-out mutant of the *PDI* gene (*OsPDIL1-1Δ*) showed lower tiller number and smaller height than wild type. *OsPDIL1-1Δ* mutant has less seed number and its seed displayed chalky phenotype. Seed analysis unexpectedly showed that the mutant contains higher amount of seed proteins than wild type, implying that down-regulation of PDI expression may be able to induce accumulation of seed proteins in seed crop plants. Knock-out rice mutants of the *BIP* and *REB*, and their-overexpressing rice plants are now analyzing too. Secondly, we have also tried to isolate new factors that control expression and stability of rice seed proteins by proteomic methods. Fifteen proteins specifically accumulated in high or low eating quality rice have been identified. They are mainly involved in plant defense and metabolism. It strongly suggests that they take part in control of eating quality through regulation of the levels of seed storage metabolites. Interestingly, it also showed that low eating quality rice contains higher amount of the defense-related proteins, suggesting that high eating quality rice is much more sensitive to pathogen than low eating quality rice. Among them, several proteins have been characterized.
3. *Osprmc3* mutant has much higher tiller number than wildtype. *Osprmc3* mutant seed showed chalky phenotype and is lighter than wild type. Analyses of other mutant seeds also showed similar phenotype to *Osprmc3* mutant seed, indicating that most of the proteins identified by proteomic method must be involved in rice seed development and their amount may be tightly correlated to eating quality. Thirdly, we examined PDI, BIP and REB amount in high and low eating quality rice seeds by immunoblotting using anti-PDI, anti-BIP and anti-REB antibodies, respectively. Result showed that their amount is not directly related to eating quality. These antibodies are applied to isolate their-interacting candidates which participate in rice seed development and quality. Now, we are testing seed and eating qualities of the identified mutants with

biochemical method. Knock-out mutant and transgenic plants including the developed technologies will bring out a high profit through patent. Besides, qualities-improved transgenic farm crops by introduction of the identified useful genes will ensure a big return to farmer and there by to nation.

<Collaborative-project 1> Development of high palatability lines through exploitation of genes associated with starch metabolism and recombinant DNA technology

1. Difference at Molecular Aspects between japonica Rice Varieties with High and Low Palatability

- (1) To identify the difference between high- and low-quality rice varieties, (high): Gopum, Ipum, Samgwang, Koshihikari and (low): Palgong, Samnam, Singeumo, Dobong, genomic PCR for major genes, Sbe1, Sbe3, Waxy in starch biosynthesis, was carried. The results showed that no differences were detected in banding pattern between high- and low-quality rice varieties.
- (2) The bands from the genomic PCR were sequenced and then the alignment of the sequences showed 12 SNPs in Sbe1 gene and one SNP in Waxy gene.
- (3) When SNP and InDel were investigated in Sbe1 gene, the differences in 7~10, 12, 16~17, 20, 22~24 positions were obviously detected between high- and low-quality rice varieties. The differences implicated the correlation in quality between high- and low-quality rice varieties.
- (4) When the SNP and InDel in the genomic sequences of Sbe1, Sbe3, Waxy genes were scrupulously investigated for eight varieties, the results showed that SNP and InDel detected in Sbe1 sequences were same for high-quality varieties, but were differed for low-quality varieties. The linkage "-AAAGGGTTG-" of SNP and InDel in Sbe1 sequences for high-quality rice group were replaced partially to "TGGGAAAC-AT" for low-quality rice group, implicating that there might be close correlation in palatability quality between high- and low-quality varieties.
- (5) The linkage "G---" in 2, 4, 6, and 9 positions of SNP and InDel in Sbe3 sequences for high-quality varieties were replaced partially to "ATTT" for low-quality rice group.
- (6) The linkage "AGA" in 4, 5, and 7 positions of SNP in Waxy sequences for high-quality varieties were replaced partially to "CGA" in Dobong and "AAG" in Samnam for low-quality rice group. There were no detection of SNP and InDel for Palgong and Singeumo.
- (7) The semi-quantitative RT-PCR with immature seeds sampled every five days after

flowering from flowering to 25 days was carried out to assess of RNA expression profiles between high- and low-quality varieties. The results showed that the RNA expression of Sbe1, Sbe3, SSS1 and SSS2A revealed highest in 10~20 days in high-quality varieties, showing higher than that of low-quality varieties.

(8) In GBSS1 gene, the RNA expression was highest in 10~20 days as middle and late periods of grain filling. The high-quality varieties showed relatively low RNA expression compare to the other genes, but Samnam as low-quality variety showed the increment of RNA expression compare to the other varieties.

2. Development of High Quality Rice by Transformation of Starch Branching Enzyme (OsSbe1)

(1) In order to express Sbe1 gene, 2,268 bp of Sbe1 ORF was inserted to create recombinant gene p35S:OsSbe1. Through transforming the p35S:OsSbe1 into Gopumbyeo seeds using Agrobacterium-mediated transformation, 1005 transgenic rice lines were created.

(2) Once the Sbe1 gene was introduced in rice, the RNA expression level in transgenic rice lines was analyzed using semi-quantitative RT-PCR. The results showed that transgenic rice lines with Sbe1 gene expressed more than that of wild type, Gopumbyeo, showing some variation among transgenic lines.

(3) The amylose contents of the transformed rice lines with Sbe1 gene ranged from 12 to 29% showing large variations. Especially, it was discovered that transgenic rice lines having 15 to 17 % of amylose content showed the largest number of plants, so they would have the potential use for developing high quality rice varieties with different level of amylose contents.

(4) The transgenic rice lines with 12%, 18% and 28% of amylose content in T2 generation, were selected to analyze enzyme activity in T3 generation. At 15 days after flowering, the immature seeds of T2 transgenic plants were sampled to compare the combined enzyme activities of Sbe1, Sbe3, Sbe4 between wild type Gopumbyeo and transgenic rice lines. The result showed that the line 13017(12.57% in T2) revealed 5.6 times higher and the line 13282 was 1.9 times higher in enzyme activity than that of wild type Gopumbyeo. The lines 13218 (18.35%) and 13145(18.04%) showed similar activities compare to wild type Gopumbyeo. However, the lines 11985-11 (28.48%) and 12101-8 (29.62%) were 0.52 and 0.32 times, respectively, showing much lower than that of Gopumbyeo.

(5) When the polished rice was analyzed to find correlation between palatability and other factors in the T2 generation of transformed rice with Sbe1 gene, compared

with the wild type Gopumbyeo and the transgenic rice with Sbe1 gene had changes physicochemical properties of rice grains. Though the Toyo Taste meter value of Gopumbyeo showed the value of 70.4, the transformed rice ranged from 61.1 to 72.6. A total of nine transgenic rice lines including six lines with higher Toyo meter values than that of Gopumbyeo (70.4) and three lines with similar values compare to Gopumbyeo were selected as elite lines.

- (6) From the T2 generation, transgenic lines with low amylose content, favorable phenotype and high yield were selected and their grains were scrupulously analyzed in terms of amylose content, agronomic traits, yield, and palatability. The result showed that they showed excellence in agronomic traits and revealed that they had higher yield. The wild type Gopumbyeo produced 602.7 kg/10a, whereas the elite rice lines produced 607.9~719.0 kg/10a. When comparing the palatability with wild type Gopumbyeo's Toyo taste value of 70.4, the transformed rice showed the similar or higher values ranging from 70.5 to 72.6, implicating the possibility of developing new high quality rice varieties in the future.

3. Development of Transgenic Rice by Transformation of Genes Related to Starch Biosynthesis

- (1) The recombinant vectors with AGPL2, Sbe1, and SUS1 which are related to starch biosynthesis have been constructed for over-expression of genes in rice plants. The AGPL2, Sbe1, and SUS1 genes were inserted into the pMJ-Glb with globulin promoter to express the genes in rice endosperm and named them pMGR, pMGA, and pMGS.
- (2) The RNAi recombinant vectors with Waxy and SSS1 which are related to amylose biosynthesis have been constructed for down-expression of genes in rice plants. The Waxy and SSS1 genes were inserted into the pCAM-35S with 35S promoter and named them pCAMW-Ri and pCAMS-Ri.
- (3) The recombinant genes of pCAMW-Ri, pMGR, and pMGR/pCAMW-Ri have been transformed by Agrobacterium-mediated short-period transformation method using rice seeds. The introduction of the target genes were identified by PCR amplification of HPT and Bar genes as selection markers.
- (4) The recombinant genes of pMGA, pMGS, and pCAMS-Ri have been transformed by Agrobacterium-mediated short-period transformation method using rice seeds. The transgenic rice plants are transplanted into pots and grow in greenhouse to harvest T1 seeds. The introduction of the target genes are being identified by PCR amplification of HPT and Bar genes as selection markers.

<Collaborative-project 2> Properties of starch-lipid and lipid components in rice endosperm affected on eating quality

The competitiveness of the rice is largely depended on the eating quality of rice, which is, in turn, affected by diverse factors including rice cultivar type, place of origin, climatic condition, cultivating and harvesting methods, and degree of dryness. In the present study, by sampling rice cultivars with different eating quality, we analyzed the relationship between physicochemical characteristics of the components in rice endosperm and investigated the relationship between palatability and physicochemical properties. Especially, we analyzed the correlation between starch lipid and lipid components in rice endosperm and pasting properties. The results were as followed:

1. Physicochemical properties of two rice kernels with distinctive difference in eating quality
 - According to the results of physicochemical properties of rice kernels from two rice cultivars, including *Gopumbyeo* and *Palgongbyeo*, There were significant differences in the palatability value obtained using a Toyo taste meter and sensory evaluation of cooking rice between two rice cultivars. *Gopumbyeo* showed higher than *Palgongbyeo* in starch lipid content, known to exist as inclusion complexes with amylose in starch granules, and its unsaturated fatty acid contents. Plant sterols in two rice samples were identified, *Gopumbyeo* of good eating quality had high contents of squalene and cycloartenol than those of *Plagongbyeo*. There were differences in composition of essential amino acids between two rice cultivars. The swelling power of rice starches of two rice cultivars higher than those of flours. In Rapid Visco Analyzer examination, pasting temperature of *Gopumbyeo* was lower than those of *Plagongbyeo*. As DSC results, the gelatinization enthalpy of the endosperm peak was observed lower in *Gopumbyeo*. X-ray diffraction patterns of starches separated from two rice cultivars, traditional A type and there was no difference in crystalline of rice starch. Hydrolysis rate of *Palgongbyeo* by glucoamylase showed higher than *Gopumbyeo*.
2. Pasting properties and lipid components in rice seven rice cultivars with different eating quality
 - Significant differences were observed in the palatability score obtained using a Toyo taste meter, which measures palatability score based on the glossiness of rice cooked, and *Samgwangbyeo* showed the highest score among the seven cultivars, followed by *Gopumbyeo* > *Chucheongbyeo* > *Ilpumbyeo* > *Palgongbyeo* > *Samnambyeo* > *Dobongbyeo*. Rice cultivars with good eating quality had high linoleic and linolenic acid composition in lipid content of starch-lipid, forming an inclusion complex with amylose.

Although the seven rice cultivars had different level of amylose, no significant differences were found. According to the RVA measurement of rice flours, the pasting temperature was the lowest in *Ilpumbyeo*, having medium eating quality among the seven rice cultivars. whereas the highest in *Dobongbyeo*. According to the DSC measurement of rice starches, the gelatinization enthalpy of the endothermic peak showed energy content was the highest in *Dobongbyeo*. Each rice cultivar also had different swelling power; in particular, *Dobongbyeo* with the lowest palatability value showed the lowest swelling power at 65°C. The free fatty acid composition showed a significant difference among the seven varieties, and all rice cultivars had high composition in oleic and linoleic acid. Rice cultivars having low palatability value showed the higher in lipase and lipoxygenase activity contribute to the peroxidation of rice lipids.. Rice cultivars of good eating quality had high contents of squalene and cycloartenol, although the seven rice cultivars had different levels of campesterol, stigmasterol and sitosterol, no significant differences were found.

3. Verification of properties of endosperm components in twelve rice cultivars with different eating quality

- As result of determining palatability value (Toyo-value) for 12 rice cultivars having different eating quality, varieties showed significant difference in order of *Koshihikari* > *Samgwangbyeo* > *Gopumbyeo* > *Chuchungbyeo* > *Hwaseongbyeo* > *Dongjinbyeo* > *Ilpumbyeo* > *Hwacheongbyeo* > *Palgongbyeo* > *Samnambyeo* > *Singeumobyeo* > *Dobongbyeo*. As result of texture characteristics of cooked rice, *Gopumbyeo* and *Samgwangbyeo* with high eating quality showed high in hardness and adhesiveness, from which they were known to have textural characteristic with chewiness. *Palgongbyeo*, *Samnambyeo*, *Singeumobyeo*, and *Dobongbyeo* with low palatability value tended to show low of linoleic acid composition in fatty acids of non-starch lipid. Rice cultivars with high and medium palatability value showed a higher linoleic acid composition in the starch-lipid complex. This result was expected that the correlation between linoleic acid composition of starch lipid and eating quality. Rice cultivars with high and medium palatability value had high squalene and cycloartenol content in plant sterols. For the swelling power of starches at 95°C, *Koshihikari* with good eating quality showed the highest value. According to the RVA and DSC measurement of rice flours and starches, significant differences in the pasting properties was observed among 12 rice flours and starches that showed differences in the palatability scores. The pasting temperature was the higher in *Palgongbyeo*, *Samnambyeo*, *Singeumobyeo* and *Dobongbyeo*, having low eating quality among the 12 rice cultivars. Such temperature

differences seemed to be related with the palatability score at a certain level. Rice cultivars with good eating quality tended to show high protein content, and the contents of Mg/K was the highest in *Kosihikari*, having good eating quality.

4. Changes of pasting properties and lipid components in rice endosperm during storage
 - According to the change of seven rice cultivars during storage for 3 months, the proportion of palmitic and oleic acid composition in free fatty acids composition tended to increase, while linoleic acid tended to decrease. Palmitic acid composition of starch-lipid tended to increase in all rice cultivars. Squalene, sitosterol and campesterol that are plant sterols tended to increase in all rice cultivars during storage. In the RVA measurement of rice flours, peak, trough, final viscosity showed a significant increase during storage. DSC results of rice starches showed a significant increase of *Sangwangbyeon* in gelatinization enthalpy. We could also obtain the results that the palatability value after storage tended to significantly decrease in all rice cultivars.

<Collaborative-project 3> Mapping and QTL identification for genetic dissection of cooked rice taste

1. A framework linkage map with 188 marker loci was constructed covering 1,902cM of twelve rice chromosomes, with an average distance of 10.1cM between adjacent two markers using 190 RIL from Suwon365 x Chucheong (S/C). The polymorphism ratio between the parents was averaged 29.2%. Out of 188 marker loci, 19 markers (10.1%) showed skewed segregation to Suwon365 and 12 markers (6.0%) showed skewed segregation to Chucheong.
2. In 190 S/C RIL population, significant correlations ($p < 0.05$, $p < 0.01$) were observed among some traits. Most of the correlations among the traits related to grain quality presented a similar pattern with previous studies. The glossiness of cooked rice (GCR) and palatability correlated positively with alkali digestion value, amylose content, and days to heading and negatively with protein content. The correlation coefficients between glossiness and palatability of cooked rice was ranged from 0.49 to 0.51. Four QTLs for alkali digestion value were detected on chromosome 6, 7, 8, and 11. The *qADV6* including *waxy* (*WX*) gene, and *qADV8* locus, explained 8.3-25.6% and 11.2-31.4% of the phenotypic variation, respectively. Five QTLs for amylose content, were detected on chromosome 6, 7, 8, and 11 and a major QTL, *qAC8*, was detected consistently for three years and explained 21.3-34.0% of the total phenotypic variation by Chucheong allele. Four QTLs for protein content were detected on chromosome 1, 6, 7, and 8. The QTL, *qPC1*, was detected for four years and explained 9.0%-20.7% of the

total phenotypic variation. Out of five QTLs for glossiness of cooked rice, two QTLs, *qGCR7* and *qGCR8*, were detected consistently for three years. *qGCR7* and *qGCR8* explained 8.8%–14.2% and 8.6%–26.1% of phenotypic variation, respectively. In BC₃F₂ of Suwon365*4/Chucheong, the allele effects of Chucheong at *qGCR7* and *qGCR8* were estimated to be 2.35 and 2.25, respectively. Three BC₃F₃ lines, SCQ04, SCQ07, and SCQ14, containing the Chucheong allele at three loci, *qGCR8*, *qGCR7*, and *qGCR6.1*, increased the glossiness of cooked rice than those of Suweon365.

3. In 182 I/M RIL population, significant positive correlations ($p < 0.05$, $p < 0.01$) were observed among GCR and GL, ST, HA and OE by the sensory test. These correlations among the traits related to eating quality presented a similar pattern with previous studies. The correlation coefficients between GCR and traits for sensory test was ranged from 0.469 to 0.506 in 2008. Five QTLs for alkali digestion value were detected on chromosome 1, 6, 10, and 12. The *qADV6.1* in RM587–RM3370, including *waxy* (*WX*) gene, explained 32.1–40.6% of the total phenotypic variation by Ilpum allele. Four QTLs for amylose content, were detected on chromosome 3, 6, 10, and 11 and a major QTL, *qAC3* and *qAC6*, were detected consistently for three years and explained 5.8–11.8% and 44.8–56.9%, respectively by Ilpum allele. Out of seven QTLs for glossiness of cooked rice(GCR), three QTLs, *qGCR3*, *qGCR6.1* and *qGCR6.2* were detected consistently for three years and *qGCR6.1* explained 18–28.3% of total phenotypic variation, respectively. Three QTLs, *qGCR10*, *qGCR12.1* and *qGCR12.2* were from Moroberekan allele and explained 5.4–9.8% of the phenotypic variation. Seventeen QTLs for four traits, glossiness(GL), taste(TA), hardness(HA) and overall evaluation(OE) by the sensory test were detected in chromosomes 1, 3, 5, 6, and 10, and the QTLs in chromosomes 3, 5, and 6 were from Ilpumbyeo allele and explained 10.9–15.7% for *qEQ3* on chr. 3, 7.3–9.0% for *qEQ5* on chr. 5, and 8.4–38.5% for *qEQ6* on chr. 6, respectively.
4. In BC₁F₃ of Palgong*2/SR25577–F₁₄–17 having Chucheong allele at two QTL loci *qGCR7* and *qGCR8*, most lines containing *qGCR7* and *qGCR8*, increased the glossiness of cooked rice than those of Palgong. Also, In BC₁F₃ of Palgong//Ilpum/Palgong, most lines having *qEQ3*, *qEQ5*, and *qEQ6* improved to eating quality than those of Palgong. The QTLs identified in this study will be helpful in marker–assisted breeding for improving eating quality of *japonica* rice and the linkage map will be useful as a *japonica* reference map.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	24
Chapter 2. Review of the research progress	27
Chapter 3. Contents of the project and research results	31
Sec.1. Development of DNA markers associated with cooked rice taste and breeding high-palatability lines	31
Sec.2. Improvement of rice quality through regulation of the amount of endosperm-specific proteins	54
Sec.3. Development of high palatability lines through exploitation of genes associated with starch metabolism and recombinant DNA technology	88
Sec.4. Mapping and QTL identification for genetic dissection of cooked rice taste	133
Sec.5. Mapping and QTL identification for genetic dissection of cooked rice taste	203
Chapter 4. Achievements and contribution to related fields	223
Chapter 5. Application plan of research results	226
Chapter 6. Information obtained during implementation of the project	234
Chapter 7. References	235

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황	27
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	31
제1절(제1세부과제) 식미 선발표지 개발과 식미증진 벼 계통 육성	31
제2절(제2세부과제) 저장 단백질 조성 및 함량 조절에 의한 벼 식미 증진	54
제3절(제1협동과제) 전분대사 관여 유전자 발굴과 제조합에 의한 벼 식미증진 계통 개발	88
제4절(제2협동과제) 벼 지질대사 및 대사산물과 식미와의 연관성 분석	133
제5절(제3협동과제) 벼 식미관여 유전자 분석을 위한 지도 작성 및 QTL 분석	203
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	223
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	226
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	234
제 7 장 참고문헌	235

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성

가. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

(1) 경제적·산업적 중요성

- 쌀은 우리나라의 주식작물임은 물론 세계 30억 인구의 주식작물이고, 연간 국내생산액 9~10조원(2001년: 10.72조원, 2002년:9.56조원, 2003년:8.84조원, 2004년: 9.9조원)에 이르며 346만명(2004년, 총인구의 7.2%) 농가인구가 종사하는 농업(재배업) 생산액의 40%를 상회하는 가장 중요한 작물로서 막대한 경제적·산업적 가치를 가지고 있음.
- 우리나라 전체곡물의 자급율은 25.3%(2004년), 쌀을 제외한 곡물자급율은 2.6%(2004년)에 불과하여 쌀을 제외하고는 거의 전량 수입되고 있어 기초식량 안보가 위협받고 있음. 곡물 수입금액은 24억666만 달러(2003년)에 이르고 이는 전액 무역적자임. 최근(2006.1.2) 농림부는 10년뒤 전체 곡물자급율은 28.8%~32.8%, 순수 식용곡물은 50.5~54.2%의 식량자급율 목표치를 정하였는데, 쌀자급율을 100% 유지하지 않고는 목표 달성이 불가능함.
- 세계무역기구에 의한 쌀 관세화 협상 결과 관세화 유예 조건으로 2005년부터 단계적으로 수입물량을 증가하여 2014년에는 총소비량의 7.95%(408,700톤)을 의무적으로 수입해야 하고, 수입물량의 10%(2005년)부터 30%(2014년)를 시장에 방출하게 되어 우리 쌀 시장 및 쌀 산업에 미칠 파급효과에 대한 우려가 큼.
- 장차 우리나라의 쌀 시장도 관세화에 의한 개방으로 갈 수 밖에 없을 것으로 예상됨. 대만의 경우 2003년 쌀시장 개방 후 2004년 수입쌀 비중이 13%정도인데 일본산, 호주산, 미국산 등이 대만산에 비해 고가품으로 인지되고 있어 고급 쌀시장이 외국쌀에 잠식당하고 있음. 반면 일본은 1999년 수입개방 이후에도 외국쌀의 수입이 좀처럼 늘지 않고 있고 (2004년 소비량의 8.8%), 수입쌀들은 저가품으로 취급되고 있으며, 고품질쌀은 도리어 수출하고 있음. 우리나라도 시급히 고품질화를 통한 수입개방 대응책을 수립해야 함.
- 우리쌀의 고품질화를 통한 시장 잠식 억제력은 대만과 일본의 예에서 보듯이 시장개방 초기에도 5% 이상이 될 것으로 판단되며 이를 금액으로 환산하면 5000억원 이상에 해당하는 경제적 가치를 가짐.

(2) 연구개발의 필요성

- 시장개방을 목전에 두고 있는 만큼 향후 10년(2005년 기준) 이내에 쌀산업의 경쟁력을 반드시 확보해야 하며 경쟁력을 위한 가장 시급한 과제는 최고품질(식미)화임.
- 쌀의 식미 결정에는 여러 요인이 관여하는데, 최근 고품질화 연구는 주로 완전미 비율

을 높이기 위한 재배, 수확후 관리, 상품화 기술, 품질 관리제도 향상에 집중되고 있음. 식미검정 결과 몇몇 우리 품종이 일본의 고시히까리와 식미가 유사하거나 간혹 우수하게 판정됨으로써 고품질 품종육성을 소홀히 하고 있는 측면이 있음. 그러나 일본에는 대부분의 품종들이 고시히까리를 능가할 수 있는 식미를 보유하고 있음을 유의해야 할 것임.

- 더욱이 우리나라의 고품질(양식미) 육종은 종래의 교배 및 선발 육종에 한정되어 있어서 품질을 진일보 시키는 데에는 한계가 있으며 기초연구가 대단히 미흡함. 특히 게놈 해석시대에 있어서 품질과 식미를 지배하는 유전자에 대한 연구는 거의 이루어지지 못하고 있음. 우리쌀의 경쟁력 유지가 지극히 우려되는 시점에서 경쟁국들의 품질향상을 위한 기초연구 강화 노력을 좌시할 수 없으며 우리도 시급히 기초연구와 분자유종을 추진하여야 함.
- 품질(식미)을 유전자 수준에서 해석함으로써 유전자 변이를 활용하여 품질을 고급화하고, 선발 지표를 개발하는 연구는 우리쌀의 국제경쟁력을 제고하기 위하여 필수적이며 매우 시급함.

나. 연구개발대상 기술의 국내·외 현황

(1) 세계적 수준

개념정립 단계	기업화 단계	●	기술 안정화 단계	
---------	--------	---	-----------	--

- 세계 쌀 생산 및 소비의 80%~90% 이상을 담당하는 아시아 국가를 중심으로 품질 및 식미 관련 유전자 발굴 및 활용에 대해 노력이 활발히 수행되고 있다.
- 일본에서는 오래전부터 쌀시장 개방을 대비하여 최고품질(양식미) 쌀을 개발하기 위한 유전육종의 기초연구를 수행해오고 있음. 고시히까리를 필두로 히토메보레, 히노히까리, 아끼타꼬마치, 끼라라397, 기누히까리 등 다수의 고품질 품종들이 육성 재배되고 있으며 철저한 수확물 관리와 상품화 및 품질관리 기술의 도움으로 최고급쌀 브랜드의 이미지를 구축하였음. 최근에 완료된 유전체 연구를 기반으로 식미 관련요소들에 대한 유전자 차원의 연구가 활발히 진행되고 있으며 분자유종이 이미 상당수준에 와 있으며, 품종을 개발하고 있음.
- 중국, 인도, 대만에서도 미질에 관계되는 여러 종류의 유전자들을 분리하여 검증하는 단계에 있으며, 또한 쌀 저장시 품질저하의 원인이 되는 유전자분리 연구도 착수하였음.
- 미국, 호주 등 자포니카쌀 수출국가들에서는 동북아 시장을 공략하기 위하여 고시히까리 수준의 고품질(양식미) 품종 육성 및 기초연구에 연구력을 집중하고 있음.
- 품질 및 식미 유전자와 이를 활용하는 분자유종 연구는 장차 쌀의 품질 경쟁력을 결정하는 핵심 분야인 바 각국에서는 노력을 경주하고 있음.

(2) 국내수준

개념정립 단계	●	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

- 1930년부터 벼 품종육성을 시작한 이래 농촌진흥청 식량과학원(구:작물과학원)을 중심으로 2004년까지 자포니카 199품종, 통일계 46품종을 육성하였음. 1970년대 통일벼 육성을 계기로 교배에 의한 품종육성 기술은 세계적인 수준임. 식미와 내재해성 문제로 인한 통일벼의 침체 이후 1980년대 후반부터는 자포니카 품종육성이 주종을 이루었고, 육종목표도 품질 향상이 우선시되어 왔음.
- 그러나 우리나라의 고품질 품종들의 식미는 아직도 일본에서 육성하여 1970년에 도입한 아끼바레(秋晴)의 수준을 벗어나지 못하고 있음. 최근 육성된 일품벼, 삼광벼, 고품벼 등 고품질 품종들이 일본의 양식미 대표품종인 고시히카리보다 간혹 우수하게 평가됨으로써 우리나라 모든 품종의 품질수준이 매우 우수한 것으로 평가하는 착오가 있음. 예를 들어 2004년 가장 많이 재배된 남평벼(2004년 전체 재배면적의 16.3%)는 식미가 떨어짐.
- 우리나라의 고품질(양식미)쌀 육종에 대한 기초 연구는 90년대에 배유 전분의 물성, 호화특성, 아밀로스/단백질 함량, 외관 등과 식미와의 상호 관련성을 중심으로 이루어졌음. 그 결과 양식미 품종이 갖추어야 할 조건은 낮은 호화온도, 저단백, 저아밀로스, 저 응집 및 치반 점도, 아밀로펙틴 단쇄비율 향상, 구수한 냄새, 투명한 외관, 얇은 겨층 등으로 요약될 수 있음.
- 그 후 기초연구는 자포니카와 인디카 품종간 교잡 후대에서 식미와 관련한 양적형질 유전자좌 분석, 자포니카 품종간 식미 기본요소에 대한 품종조사와 그들의 DNA마커들과의 관련성 등 단편적인 연구들만이 수행되었고, 식미 개량을 위한 유전자 차원에서 기초 및 활용 연구는 시도되지 않고 있음.
- 고품질(양식미)쌀의 육종은 유전자원간 교배 후대에서 전통적인 방식의 윤기, 향기, 맛, 찰기를 평가하여 선발하는 식미검정(또는 식미기)에 의존하고 있어서 품질육종에 한계가 있음. 장차 우리쌀의 품질 경쟁력을 지속적으로 높이기 위해서는 품질 및 식미 관련 유전자를 적극 발굴하고 유전자 선발표지를 활용하는 분자유종을 반드시 수행하여야 함.

2. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표 및 성격

(1) 연구개발의 최종목표

- 고품질(양식미)와 관련된 전분, 단백질, 지질 대사 관련 유전자를 발굴하여 고품질 및 양식미 쌀 개발을 위한 선발표지와 분자유종 체계를 확립함으로써,
- 분자표지 선발(MAS)을 통한 고품질(양식미) 계통을 육성하고, 유전자 변이와 형질전환을 이용한 고품질(양식미) 쌀(GMO) 계통을 개발하고자 한다

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 연구 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황	
국 내	작물과 학원	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고품질 벼 육종 연구 (전통육종방법): 교배육종과 약배양 및 선발을 통한 고품질 품종 육성연구 ○ 기능성 벼 개발: 아이소플라본 생합성 유전자 등의 형질전환을 통한 기능성 벼 개발 ○ 벼 분자표지 이용 선발효율 증진 및 신품종 개발 ○ 고품질 영양강화 기능성 벼 품종 개발: 배유내 자당 유입 증가, 단백질, 지질, 당분, 섬유소, 2차대사산물의 강화를 통한 건강기능성 증가 및 배유유전자 조절을 통한 영양 고품질벼 육성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 일품벼, 고품벼, 삼광벼 등 고품질 품종과 다수의 우량 품종을 육성 ○ 형질전환체 개발 중 ○ 유전분석 재료 육성 및 품질관여 QTL 분석 ○ 전통육종법과 병행하여 품종 개발 중
	농업생명공학 연구원	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한국, 일본, 중국 벼 유전자원에 대해 품질, 기능성, 내재해성 등 주요 육종형질을 평가중임. ○ 미질관련 유전자군 검출 및 기능분석: 전이인자 삽입변이체를 이용하여 종자형성에 관여하는 유전자군을 검출중이며, 향후 식미 및 기능성과 관련이 있는 유전자를 분리할 예정임. ○ microarray를 이용한 종자 발현유전자 분리 연구: 식미와 관련있는 변이체 선발 및 유전자 연구 ○ 대사공학 신기술을 이용한 비타민A 벼 개발연구 ○ 인체 모유단백질 생산 유전자인 락토펜 벼 형질전환체를 가진 기능성 쌀 개발 ○ 쌀 저장단백질 글루테린 유전자 억제 벼 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양식미 및 가공용 품종개발을 위한 다수의 교배모본을 선발하였음. ○ 종자 성분 관련 변이체를 선발하고, 고정계통을 육성중임. ○ 종자발달 관여 유전자칩 개발. ○ 형질전환체 개발 중 ○ 형질전환체 개발하여 조사 중 ○ 형질전환체 개발하여 조사 중
	농림기술관리센터 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돌연변이를 이용한 저 피틴산 기능성 쌀 종자의 개발 (강원대, 1998 완료) ○ 고 항산화활성, 활성물질을 함유하는 쌀 생산기술 개발 (건국대, 2003 완료) ○ 필수아미노산 대량축적 유도에 의한 고품질벼 생산 (농생공원, 2001 완료) ○ 벼 건강기능성 품종 및 제품 개발 (서울대, 2004 완료): 돌연변이와 전통육종을 이용하여 거대베아미 등 건강기능성이 우수한 품종을 개발 ○ 철분흡수관련 유전자 개량에 의한 식물체내 철분대사 증진 벼 개발 (충북대, 2004 완료) ○ 쌀 호화점도 특성 및 식이섬유함량 다양화 소재 개발 (진행중) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저 피틴산 기능성 쌀 종자를 개발함. ○ 몇가지 항산화 활성이 높은 유전자원 선발 및 계통 육성 ○ 고 단백질 변이주 작성 및 유전자 형질전환체 개발 ○ 거대베아미 등 건강기능성이 우수한 품종을 개발하고 품종 등록. ○ 철분흡수 관여 유전자를 구명하고 형질전환체를 육성하고 조사 함.
	바이오그린21 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돌연변이체를 이용한 미질관련 유전자군 검출 및 기능분석: 종자성분 관련 삽입돌연변이체를 선발하여 관련 유전자를 분석하고, 고품질 쌀 육종 기반기술을 지원함. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 종자성분 관련 삽입돌연변이체를 선발중 ○ T-DNA와 Ds삽입 돌연변이체

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방산 대사공학을 이용한 기능성 고미질 벼 품종 개발: T-DNA와 Ds삽입 돌연변이를 이용한 유전자 기능 구명과 유전자 재설계를 통한 고미질 형질전환 벼 품종 개발 ○ 벼 기능성성분 관련 유전자 탐색 및 활용 연구: 라이신, 아밀로스, 셀룰로스, 비타민 등을 대상으로 중국 측과 공동 유전자원을 개발하고 육종모본을 탐색함. ○ 고품질 영양강화 기능성 벼 품종 개발: 배유내 자당 유입을 증가시키고, 단백질/지질/당분/섬유소/2차대사산물이 강화시키며, 거대배 등 기능성 쌀을 개발하고자 연구 중임. 	<p>집단을 구축함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 고라이신 유전자원 다수 선발 확보
--	--	--

2. 국외 연구 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용 및 연구성과의 활용현황
일본	<ul style="list-style-type: none"> ○ 일본에서는 고시히까리를 중심으로 지속적인 양식미 품종 육종이 이루어지고 있고, 최근에는 니폰바레, 고시히까리의 두 자포니카 품종간 고도의 NILs를 육성(M. Yano 등), 적극적으로 식미관련 유전자 발굴을 시도하고 있다. 또한 아밀로스 함량을 낮추는 dull 변이체들을 개발하여 육종이 적극 이용하고 있으며, 밀키퀸 등의 양식미 품종을 육성하였다. ○ 고시히까리의 양식미 형질 분석을 위해 backcross inbred line (BIL)에 대해 관능검정을 통하여 2, 3, 6, 7, 10번 염색체상에서 6개 QTLs를 확인하였으며, 6번 염색체 단완 말단의 QTLs가 가장 큰 effect를 가지는 것으로 나타났으며, 상가적 효과는 1.5였고, 2, 6, 및 7번 염색체 QTLs는 CSSLs로 그 효과를 확인하였음 (Takeuchi 등, 2005).
국외 중국	<ul style="list-style-type: none"> ○ 중국 또한 다양한 CSSLs(chromosome segment substitution lines)을 육성하여 식미관련 유전자 차원의 접근을 수행하고 있으며, Bao, Hu 등은 DH(double haploid) 집단을 육성, 꾸준히 식미관련 QTLs를 보고하고 있다. 향기 형질에 관련된 연구도 지속적으로 이루어져, 최근 A. Vana- vichit 등은 2AP(2-acetyl-1-pyrroline)의 위치와 기능에 대해 보고하였다.
그 외	<ul style="list-style-type: none"> ○ 쌀의 식미와 관련된 형질에 대한 연구는 amylose content(Juliano, 1973), gelatinization temperature(Little et al, 1958), gel consistency (Cagam-pang, 1973) 등을 시작으로, 최근에는 유전체 연구를 기반으로 식미 관련요소들에 대한 starch branching enzyme, wx 유전자 변이, soluble starch synthase III 유전자를 밝히고 있고, 인도, 대만에서도 미질에 관계되는 여러 종류의 유전자들을 분리하여 검증하는 단계에 있으며, 또한 쌀 저장시 품질저하의 원인이 되는 유전자 분리 연구도 착수하였다. ○ 전분은 주로 amylose와 amylopectin으로 구성되어 있는데, amylose는 주로 -1,4 linked glucose 분자와 소수의 -1,6 linked branches의 긴 선형체인으로 되어 있고, amylopectin은 짧은 -1,4 linked glucose 분자와 더 빈번한 -1,6 branches로 구성되어 있는데(Banks and Muir, 1980), 이들 두 종류의 분자들이 결합하여 semi-crystalline

starch granule을 형성하고 여기에 lipid와 phosphate가 결합하게 되는데 이들의 비율은 종에 따라 다양하며 그 비율이 양식미를 좌우할 수 있다. 아밀로펙틴은 ADP-Glc pyrophosphorylase (AGPase), soluble starch synthase (SS), starch-branching enzyme (SBE), starch-debranching enzyme 및 granule-bound starch synthase I (GBSSI) 등의 공조작용에 의하여 합성되어진다(Smith et al., 1997). Starch branching enzyme (SBE)은 -polyglucans에 단지 -1,6 glucan branches를 도입하며 amylopectin의 미세구조에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한, SBE는 -1,6 glucan branches가 위치하는 amylopectin tandem-cluster 구조의 결정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Jenkins et al., 1993). 이러한 전분 합성에 관여하는 유전자들의 적절한 조합에 의해 아밀로펙틴의 구조를 변형시키고 함량을 높임으로써 고도 양식미 쌀을 개발할 수 있다.

- 단백질의 경우 일반적으로 함량이 낮을수록 식미가 개선되는 것으로 알려져 있다. 현재까지 알려진 쌀 저장 단백질의 합성 및 저장과정은 glutelin, globulin, prolamin에서 잘 보고가 되었는데 glutelin과 globulin 단백질 경우 51-57 kDa의 precursor가 합성되면 먼저 N-terminal signal peptide가 잘려 나간 후 분해를 거쳐서 34-39 kDa의 alpha subunit과 21-22 kDa의 beta subunit으로 만들어지며 disulfide bond가 형성되후 최종 산물이 만들어지며 prolamin 경우는 N-terminal signal peptide가 잘려 나간 후 나중에 glycosylation된다. 이 저장단백질은 몇 가지 메카니즘에 의해서 uncontrolled premature degradation으로부터 보호되는데 주요 메카니즘은 특정 membrane-bounded storage organell에 구형과 비정형 형태의 두 가지 타입의 protein body (PB) 형태로 종자에 저장되어 분해로부터 보호된다 (Müntz, 1998). 그러나 이러한 저장단백질의 형태 및 종류와 단백질의 함량과 식미와의 관련성을 검토한 보고는 매우 미흡한 실정으로 식미증진을 위해서는 관여 유전자 연구가 필수적이다.
- 쌀의 지질의 함유량 자체는 쌀 품종간 또는 계통간에 차이가 없기 때문에 지질의 함량 및 조성 등은 식미와 연관이 없다고 알려져 있다. 쌀의 지질은 caryopsis coat, aleurone layer 및 embryo를 포함하는 bran 분획에 약 20%(건물 중량당)이상 함유되어 있으며, 이들 지질은 0.1~1 μ m 정도 크기의 lipid body 또는 spherosome의 형태로 되어 있다. 또한 caryopsis 전체가 포함되는 현미에는 2.9%의 조지질이 함유되어 있으며, 이들 조지질 중 51 %는 embryo에 함유되어 있다. 그러므로 도정에 의해서 17% 정도가 endosperm에 잔존하게 되는데 이들 지질조차도 배유의 바깥 부분에 주로 분포하고 있어, 도정도를 증가시킬 수록 지질의 함량은 감소한다. 한편 동일계통의 쌀 품종별 지질함량은, 현미상태에서는 2.1~3.2 %의 분포를, 백미의 경우에는 0.61~0.95 %의 분포를 보이고 있으며, 동일한 품종도 재배조건에 따라서 현미는 1~4 %, 백미는 0.2~2 %의 분포를 보인다. 그러므로 식미와 연관지워 지질 성분의 영향을 검토하기 위해서는 bran 분획(non-starch lipid)과 starchy endosperm 분획(starch lipid)을 구분지워 검토하여야 할 것이다. 대부분의 starch lipid는 전분 분자 중 아밀로오스의 helical structure의 부분과 복합체의 형태를 띠면서 존재한다고 알려져 있다. 이러한 amylose-lipid complex는 전분질 식품의 소화 특성과 밀접한 관련성이 있어, 아밀로오스 분자 사슬의 길이 뿐만 아니라 amylose-lipid complex의 구성 지질의 조성에 따라 소화특성 및 식미(물성)이 다르다. 실제로 linoleic acid가 복합체의 주요 구성 지질 분자인 경우에는 소화 전분물의 점성이 높고, 전분 gel의 이장현상이 낮아 식미(조식감)가 좋다. 한편 종자의 등숙기에

		<p>linoleic acid 생산에 필수적인 효소로 microsomal ω-3 fatty acid desaturase를 들 수 있고, 실제로 벼에 옥수수 Ubi1-P-int와 콩의 GmFAD3 cDNA를 포함하는 재조합 DNA를 형질전환 한 결과 linoleic acid의 함량을 10배 증가 시켰다는 보고가 있다. 이처럼 양질의 발현에 관련이 있는 유전자의 발현을 조절함으로써 다양한 형태의 식미관련 돌연변이체의 확보가 가능할 것이며 이들로부터 양질미 육종에 유망한 후보 계통의 육성이 가능할 것이다.</p> <p>○ 식미와 관련된 QTL에 관한 연구는 대부분 indica와 japonica의 조합에서 이루어졌기 때문에 자포니카의 식미 개선을 위한 유전연구는 매우 미흡한 상태이고, MAS를 통하여 식미 선발을 하기 위한 마커도 개발되어 있지 않다.</p>
--	--	---

3. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 식미를 예측할 수 있는 분자표지는 단편적으로 일본에서 검토 개발되어 있지만 그 정확성이 높지 못하다. 본 연구에서 개발한 식미 선별 표지는 세계최초로 식미를 가장 정확히 예측할 수 있어 그 이용성이 기대된다. 그 결과는 SCI 저널(J. Agric. Food Chemistry, 57(7): 2754-2762, 2009년 4월)에 발표하였고, 특허도 신청하였다. 이미 다른 연구들에서 식미가 우수한 계통을 육성하기 위하여 이 분자표지를 활용중이다.
- 식미 관련 QTL을 분석하고, QTL-NIL을 만들어 식미를 검정한 것은 국내에서는 본 연구에서 최초이며, 세계적으로도 일본에서 일부 실시하고 있다. 이 분자유종으로 육성한 계통은 앞으로 고식미 품종 육성에 활용될 것이다.
- 형질전환에 의해 단백질함량을 조절하고, 전분 가지화 효소 유전자를 형질전환하여 식미가 변화된 계통을 만든 것은 아직 보고되지 않았다. 본 연구에서도 형질전환 계통을 고정 중이지만 금후 활용성이 기대된다.
- 식미와 지질 성분들간의 관련성을 검토한 연구는 거의 없다. 본 연구결과에서 얻어진 지질 성분과 식미와의 관련성 연구는 향후 고식미를 위한 성분 육종시 중요한 자료가 될 것이다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 <제1세부과제> 식미 선발표지 개발과 식미증진 벼 계통 육성

1. 재료 및 방법

가. 분석재료

식미 검정에는 식미가 다양한 22개의 자포니카품종과 24개의 인디카 품종이 사용되었고 계통 육성을 분석집단으로는 고시히까리/삼남 조합의 F9 396개 RIL을 사용하였다(표 1-1). sucrose synthase3 유전자의 haplotype 분석을 위해서는 35개의 재배품종과 8개의 야생종을 사용하였다(그림 1-7 참조).

표 1-1. 식미검정에 사용한 품종

품종	아종형	품종	아종형
Kopum	자포니카	Ciliwung	인디카
Samgwang	자포니카	Cisokan	인디카
Ilpum	자포니카	Cibodas	인디카
Chucheong	자포니카	Jatiluhur	인디카
Dongjin	자포니카	Kalimutu	인디카
Sinkemo	자포니카	Cirata	인디카
Hwaseong	자포니카	Memberamo	인디카
Hwacheong	자포니카	Ciherang	인디카
Dobong	자포니카	Sintanur	인디카
Samnam	자포니카	Cimelati	인디카
Palkong	자포니카	Maros	인디카
Hitomebore	자포니카	Singkil	인디카
Bekjinju1	자포니카	Batanghari	인디카
Seonong4	자포니카	Conde	인디카
Onnuri	자포니카	Angke	인디카
Manmi	자포니카	Batang Gadis	인디카
Giho	자포니카	Batang Piaman	인디카
Geuman	자포니카	Cigeulis	인디카
Nakdong	자포니카	Fatmawati	인디카
Hexi41	자포니카	Konawe	인디카
Samdeok	자포니카	Logawa	인디카
		Pepe	인디카
		Tukad Balian	인디카

나. 식미관련 형질 분석

밥의 식미에 관련된 미질에 알카리붕괴도(alkali digestion value, ADV), 아밀로스함량 (amylose content, AC, %), 단백질함량(protein content, PC, %) 등 전분의 이화학적 특성과 밥이 소화되는 과정의 윤기치(glossiness of cooked rice, GCR)는 Toyo mito-meter(모델: MA-90A, 90B)를 이용하여 분석하였다.

알카리붕괴도는 쌀을 1.4% KOH 용액에 담구어 30℃ 인큐베이터에 23시간 두었다가 쌀의 퍼짐정도를 1-7등급으로 결정하였다. 아밀로스함량은 Juliano (1971) 방법에 따라 Rapid Flow Autoanalyzer를 이용하여 starch-iodine blue color의 상대적 흡광도를 측정하여 결정하였다. 단백질함량은 Micro-Kjeldahl 법으로 FOSS:2300 Kjeltac Analyzer를 이용하여 측정하고 5.95값을 곱하여 질소함량을 결정하였다.

Toyo mito-meter기를 이용한 밥의 윤기 (GCR) 측정은 쌀 완전미 33g을 평량하여 캐스터에 넣고 10분간 끓는 물에서 호화시키고 3분간 실온에서 식힌 후 MA-90B에서 윤기치를 측정하였으며, 시험은 2반복 수행하였다. 식미 관능검정은 식량과학원의 방법에 준하였는데, 300g의 백미를 씻은 후 동일한 방법으로 전기밥솥에서 취반한 후 11명의 잘 훈련된 식미검정 요원에 의하여 수행하였다.

다. 분자표지 개발

분자표지 개발은 세 분야로 접근하여 수행하였다. ① 지금까지 보고된 식미 또는 품질 구성성분의 분자 마커: 이들에 대해 프라이머를 만들어 우리 품종에 대해 다형성을 검정하고 분석을 수행하였다. ② 보고된 QTL(양적형질유전자좌)들을 대상으로 QTL 내의 후보유전자 발굴 및 마커 개발: 보고된 QTL 및 제3협동과제에서 밝혀지는 QTL 들을 대상으로 QTL 내의 염기서열을 genomics DB를 이용하여 후보유전자들을 찾은 다음, 염기서열 5'부근의 exon부위에 대해 5개 품종간 염기서열을 TA-cloning 방법으로 분석한 후 다형성인 염기서열 부위에 대해 프라이머를 제작하여 개발하였다. ③ 전분, 단백질, 지질 특성에 관계되는 후보 유전자들을 유전체 DB에서 임의로 찾은 다음 위와 마찬가지로 염기서열을 분석한 후 다형성을 보이는 부위의 프라이머를 제작하여 품종들을 검정하였다. 사용한 genomics DB는 주로 <http://www.gramene.org/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/download.html> 이었으며, 프라이머 제작에는 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> 와 <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html> 를 주로 사용하였다.

모든 마커를 PCR 마커로 제작하였으며, 기본적인 PCR 프로토콜은 다음과 같다. PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc.)를 기본 장치로 사용하였다. 샘플 당 amplicon의 양은 기본 20μl이었는데, 여기에는 2 μL의 DNA(농도 20 ng/μL), 2 μL의 10× buffer containing 25 mM MgCl₂, 1 μL의 2.5 mM dNTPs, 1 unit의 Taq Polymerase (Intron Biotechnology, Korea), 그리고 1 μL의 forward와 reverse primers (10 μM)가 포함되어 있다. 염기서열 분석을 위한 PCR 반응에 1 unit의 ExTaq polymerase (TaKaRa)를 사용하여 reaction volume을 50 μL

로 하였다. 모든 PCR 증폭 반응은 35 cycles로 하였는데, 1 min at 95°C, 30 s at 55 °C, and 1 min at 72 °C를 기본 사이클로 하였다. Ohtsubo et al.(2002, 2007)의 STS 마커 증폭에는 95 °C 5 min, 다음에 40 cycles of 96 °C for 1 min, 62 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min.을 사용하였다. Bao et al. (2006a, b)가 개발한 마커는 5 min at 94 °C, 35 cycles of 45 s at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C, 그리고 final extension of 7 min at 72 °C 방법으로 하였다. PCR amplicon들은 3% agarose gels에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 관찰하거나, SNP나 염기서열 다형성 차이가 매우 미세한 경우에는 8%의 polyacrylamide gels에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색한 후 조사하였다.

sucrose synthase 3유전자의 haplotype 분석을 위한 염기서열 분석도 마찬가지로 1kb 정도의 간격으로 프라이머 셀들을 제작하여 PCR한 후, TA cloning 방법을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

라. 통계분석

모든 유의성 검정은 SAS (version 8.2) 통계프로그램으로 수행하였으며 상관분석과 회귀분석도 실시하였다. 회귀분석은 Toyo식미치와 관능식미치를 종속변수로 놓고, 분자마커에 의한 검정 결과를 모든 마커마다 0 또는 1의 binary 마커 방법으로 변환하여 그 값들을 독립변수로 놓아 분석하였다. 이 때 편회귀분석을 실시하여 분자마커간에 weighting을 직접 비교할 수 있게 하였다. 표준 편회귀식은 유의한 마커만을 선정하여 작성하였다. 분자마커 분석에 의한 품종간 cluster 분석은 NTSYS의 UPGMA 방식으로 구하였다.

마. 인공교배 및 세대진전

○ 인공교배: 초월분리를 목표로 조상을 달리하는 식미우수 유전자원간, 또 유전분석과 RILs 육성을 위하여 고식미와 저식미 품종간 다양한 인공교배를 실시하였다. 또한 QTL-NILs (근동질유전계통)을 육성하거나 특정 마커 또는 단순유전자하는 형질을 도입할 때에는 여교배법을 이용하였다.

○ 세대축진: 벼는 열대작물로서 우리나라에서는 포장에서 년 1회 재배될 수 있다. 본 연구 시에는 식량과학원과 서울대의 세대축진온실 또는 국제벼연구소(IRRI, 필리핀 소재)를 이용하여 년 2-2.5회 재배함으로써 육종연한을 단축시켰다.

○ RILs(재조합자식계통) 육성: 본 연구에서는 대부분의 실험항목에서 RILs가 이용되며, 이미 여러 조합에서 F5-F7 세대의 RILs를 제4 및 제5 세부과제에서 육성 보유하고 있던 것을 세대 진전하면서 사용하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 자포니카 식미 평가 및 선발 표지 개발

(1) 자포니카 식미 선발 표지 개발

(가) 기존에 보고된 마커의 발굴 및 검정

Otsubo등(2002, 2003, 2007)이 식미와 관련하여 개발한 마커 20개와 Bao등 (2006)과 He등 (2006) Zeng등(2007)이 보고한 전분 합성 관여 유전자를 이용하여 제작한 마커 16개 및 Kobayashi등(2007)이 개발한 점성 관련 마커 1개 총 37개 마커를 식미가 다양한 22개 품종을 검정 하였다. 그 중 Otsubo등이 개발한 마커 중 4개는 증폭되지 않아 16개 마커만 사용하였고, Bao등이 개발한 것 중에서는 SSIIa 만이 사용한 품종들에 다형성을 보여 검정에 사용하였다(표 1-2).

표 1-2. 기존에 보고된 마커

PCR marker	marker type	chr.a	primer sequence	
			forward (5'---3')	reverse (5'---3')
Ohtsubo et al. (2002;2003); Ohtsubo & Nakamura (2007)				
A6	STS	7 (J&I)	CCAGCTGTACGCCTGTACTAC	CCAGCTGTACGTCTTCCCCAGC
A7	STS	12(J), 11(I)	TGCCTCGCACCAGAAATAG	TGCCTCGCACCATGAG
B1	STS	11(J&I)	GTTTCGCTCCTACAGTAATTAAGGG	GTTTCGCTCCCATGCAATCT
B43	STS	9(J), 2(I)	GGCCGGCATGACTCAC	ACTGGCCGGCATCAAGAC
F6	STS	4(J&I)	ACCACTCCATATATATCATCAAAG	ACCACTCCATATCACCACAAGG
G4	STS	1(J&I)	GAGACCGATATGCGATTC	GTGGTGTTTAGATCCAGAGACTTA
G22	STS	9(J)	CTCACTCAAATTTACAGTGCATTTTCTTG	AGGGCCATGATACAAGACTCTGT
G28	STS	1(J&I)	GGCGGTTCGTTCTGCGAT	GGAGAATCCCACAGTAAGTTTTTCTTTG
J6	STS	11(J)	GTCGGAGTGGTCAGACCG	GTCGGAGTGGATGGAGTAGC
M2CG	STS	8(J&I)	ACAACGCCTCCGATGA	ACAACGCCTCCGACAACAAGAT
M11	STS	6(J)	GTCCACTGTGACCACAACAT	GTCCACTGTGGGATTGTTC
P5	STS	10(J)	ACAACGGTCCGTCCTTGCTT	ACAACGGTCCAACAGATACTTTTGA
S13	STS	1(J&I)	GTCGTTCCCTGTGGTTAGGACAGGGT	GTCGTTCCCTGCTGGTGTCTCAGAT
T16	STS	12(J&I)	GGTGAACGCTGTAGTTGGAATATA	GGTGAACGCTCAGATTTAAATATAAT
WK9	STS	9(J&I)	CCCGCAGTTAGATGCACCATT	CCGCAGTTAGATCAAGTGGC
E30	STS	1(J&I)	TACCTGGTTGATGTATACAGATCTGGTT	ATCCCTCGATCCCTCTAGCATTAT
B7	STS	2(J)	CAGGTGTGGTTACAAGGATGA	CAGGTGGTTCACGGCCTTT
G49A	STS	11(J)	AATCCAGACATGAAATTTATATGCAGATA	AATCCAGACATGTTGTCTCAATTTTGTG
G81	STS	6(J&I)	TACCTGAACCAGCAAGCATGCGCG	TACCTGAACCAGTATAATCTTTG
P3	STS	5(J), 6(I)	AACGGGCCAAAAACGGAGGT	AACGGGCCAACGCAG
Bao et al. (2006a,2006b)				
Wx (SNP)	dCAPS/AccI	6	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	TTCCAGCCCAACACCTTAC

SS1 (SSR)	SSR	6	GATCCGTTTTTGCTGTGCC	CCTCCTCTCCGCCGATCCTG
SBE1(SSR)	SSR	6	ATTTCTTTGGCCACAGGCGA	CCCAGATTCGGAACAAGAAC
SBE1(STS)	STS	6	GAGTTGAGTTGCGTCAGATC	AATGAGGTTGCTTGCTGCTG
SBE3(SNP)	dCAPS/SpeI	2	GTCTTGGACTCAGATGCTGGACTC	ATGTATAACTGGCAGTTCGAACGG
SSIIa	SNP	6	F7:CTGGATCACTTCAAGCTGTACGAC	R1:GCCGGCCGTGCAGATCTTAAC
			F22:CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC	R21:ACATGCCGCGCACCTGGAAA
He et al. (2006)				
SS1(STS)	STS	6	TCTAGATTGCTACACGTGAGAGG	TCTCCACGATAACTTCCACC
SBE3(STS)	STS	2	TCGGTCAATTCGGTTAGTCTCCTC	ACATCCTCTAGCATACTGGCGACTC
SssIIa	STS	6	TCTAGATTGCTACACGTGAGAGG	GGAGCCACCTGTAAAGCGTG
Isa	STS	8	CCTGTCTTGACAGTGCGGTA	GCACGGTTCTGATGTACGAGAG
Pul3	STS	4	GGGTTCGCTTTCACAACACAG	GTCACGACATAAGAGAAGCTGC
Pul5	STS	4	AGTTCGCTAGTCATCTGCTCG	CCACATGTCTTGTCTCCACTT
Zeng et al. (2007)				
P2	STS	10	ATTAGCCGGTAAATGGATGAGTTC	AAGCAATACTAATCCCTCCAAACC
P3A	STS	10	AATCCAACGCATCAAGGCTGGC	ACAATGCCAAACACCAGGAACTCG
P4	STS	10	TGAGCTTTACCTCCCCTCCTAACC	TCCACCTTTCTCTCTCATCCCAC
P7	STS	10	AGTTAAACAACCTCCCCACTGC	GGGTAGGATAGGGGATAAGGAGC
Kobayashi et al. (2008)				
KA43	SSR	2	CCTTTCTGAATGCGGAATTT	GAAATGATGGCATGGGAGAT

(나) QTL 및 식미 후보유전자들을 이용한 마커 개발 및 검정

① 식미 관련 마커 개발

제3협동과제에서 동정한 QTL과 최근 입수한 QTL분석 정보로부터 Gramene, TIGR, NCBI 등의 DB를 이용하여 마커 위치를 확인하고 후보 유전자들을 선발하였다(표 1-3). 후보 유전자들에 대하여 5개 이상의 품종에 대해 염기서열을 분석하였고, 염기서열에 차이가 있는 부분(InDel 또는 SNP)을 이용하여 프라이머를 제작하고 마커를 17개 개발하였다 (표 1-4). 이들을 이용하여 식미가 다양한 품종 22개와 선발계통들을 검정하였다.

표 1-3. 식미와 관련하여 선발한 후보유전자 또는 QTL과 그로부터 개발한 마커

source	QTL location	chr	candidate gene	clone	markers developed
Kwon et al. (2007)	OSR19-RM587	6	<i>granule-bound starch synthase1</i>	AP002542	GBSS1
	RM234-RM47	7	<i>sucrose synthase 3</i>	AP004988	S3cI, S3cII
		7	<i>trehalose phosphatase</i>	AP004341	TreB
	RM547-RM72	8	<i>UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase</i>	AP003875	AcPh
	RM20b-RM332	11	<i>glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase</i>	AC138454	GPA
Suh et al. (2004)	OSR8-OSR9	2	<i>aspartate aminotransferase</i>	AP003991	AMs
Wada et al.	RM2887	10	<i>non-cyanogenic β-glucosidase</i>	AC074354	CBG

(2007)	RM1246	12	<i>Phosphoserine phosphatase</i>	AP003727	PP2
	RM1246	12	<i>OsMAD20 MADS box family</i>	AL731752	MAD
	RM4853	3	<i>Homeobox domain containing protein</i>	AC119747	HP
Genomics DB		1	<i>ADP-glucose pyrophosphorylase/shrun-ken gene</i>	AP004317	SH51

표 1-4. QTL 또는 후보유전자로부터 새로 개발한 식미 검정용 마커

marker name	marker type	chr	primer sequence	
			forward (5'---3')	reverse (5'---3')
S3cI	Indel	7	CCACTCTCATGTCCTTGAAC	GCCATGACATTTGGACAT
S3cII	dCAPS/TaqI	7	TTCCATGATGTGCCACTCTC	GGACAAATGTTTTTCAGTGAATAAAT
TreB	Indel	7	CACTCCAGTTCCTGCTCAAA	CACTCCAGTTCCTGCTCAAA
AMs	SSR	2	CTTCCAAGGACCCCATCCT	CCCAACATCTCCGTCAGAAT
GPA	SSR	11	AATACGCGGCCTTCTCCTAT	TTGATCCGAATGGGTCAAAAT
GBSS1	SSR	6	CAAATAGCCACCCACACCAC	CTTGCAGATGTTCTTCCCTGATG
AcPh	dCAPS/MseI	8	AGTTGTGGTTTAAGCATAGG	ATTGTCCTTTTCTTTAAAGTTTATTA
CBG	SSR	10	AGCTTCCCTAATGGCTTCGT	ATTTGCCAACTTTTGGATGG
SH51	dCAPS/SpeI	1	ATTCTTGATGAAAATAATTAAGTAG	GGTTAACCATCTTATAAAAATTTGTC
MAD	STS	12	TAACAACCACGCGCCGAGAA	GAGCGTTCTTTTCTTTCCGGTA
HP	STS	3	TGGAGGAGATGTACGTCGAG	GAAGTCGAGGTGGTCCATGA
PP2	CAPS/MseI	12	TTTGAATAGGTCCACTGCTT	CCATGCATCTCATTAGTCAA

②. Dominant SNAP 마커의 탐색

마커를 육종 선발에 접목 시키면 보다 저렴하고 효과적으로 많은 집단의 선발을 완성할 수 있기에 본 연구에서는 dCAPS마커와 SNAP 개발 작업을 착수 하였으며 새로 개발한 검정용 마커를 변경하여 새로운 SNAP 마커를 개발할 수 있었다(표 1-5).

표 1-5. 선발용 SNAP 마커

original primer	SNAP primer name	sequence	PCR condition of SNAP primer
AcPh	AcPh-T	F:CACACAATTGTCCTTTTCTTTAAAGTTTACTAA R: TCAGGTATGCCTGCATATGTTTACTTT	94oC 5min 28 cycles: 94oC 30sec, 63 o C 1min 72oC 10min
S3cII	S3cII-T	F:CATCCAAATTCTGTTTATTTATTCAAAAATCATCCT R:AGTAAATGCACTCTTTATCCAGCTAACATCAGCA?	94oC 5min, 28 cycles: 94oC 30sec, 64oC 1min 72oC 10min
PP2	PP2-A	F:AAGAACAAAGGAAGGTTGTGGCAAGAAATATTA? R:CAGCAACATGGCAGAGTGGAGAGTTAAAA?	94oC 5min 28 cycles: 94oC 30sec, 63oC 1min 72oC 10min

(2) 식미가 다양한 자포니카 22개 품종의 식미 및 관련특성 점검

식미가 다양한 22개 품종을 Toyo 식미기를 이용하여 윤기치(식미치)를 측정하였고, 또한 단백질 및 아밀로스 함량, 아밀로그래프 특성을 측정하였으며 형질들 간의 상관관계를 구하였다. 상관관계는 기존에 보고된 것과 유사한 경향이였다(표 1-6, 1-7). 식미 및 관련 특성들은 해당 품종들에 대하여 지금까지 알려진 식미 및 관련 특성 정보와 일치하는 경향이였다.

표 1-6. 22개 자포니카 품종의 식미치 및 식미 관련 형질 값

Cultivar	P	ST	M	AC (%)	PC (%)	PV ^a	HPV ^a	BDV ^a	CPV ^a	SBV ^a	CTV ^a
Koshihikari	84	0.25	83.98	18.38	5.91	285.39	208.8	76.58	284.39	-1	75.59
Gopum	78	0.18	76.86	19.93	6.4	255.11	172.95	82.17	251.72	-3.39	78.77
Samgwang	82.6	0.28	82.35	18.67	6.3	248.86	168.47	80.39	258.39	9.53	89.92
Ilpum	83.1	0.39	83.5	18.87	6.28	235.92	182.97	52.95	252.86	16.94	69.89
Chucheong	75.4	0	76.86	19.44	6.31	223.83	146.08	77.75	236.67	12.83	90.59
Dongjin	78.4	-0.05	77.72	19.36	6.11	239.61	131.86	107.75	223.39	-16.22	91.53
Sinkeumo	61	-0.4	60.82	16.62	7.32	231.61	157.69	73.92	256.61	25	98.92
Hwaseong	77.1	-0.2	77.72	18.73	6.19	245.78	141.31	104.47	238.72	-7.05	97.41
Hwacheong	77.77	-0.32	76.86	18.85	7	222.28	150.94	71.33	237.86	15.58	86.92
Dobong	49.83	-1.24	49.99	15.11	7.89	298.95	192.47	106.47	257.14	-41.81	64.67
Samnam	65.03	-0.95	65.03	16.51	7.1	246	181.64	64.36	263.19	17.2	81.55
Palkong	68.6	-0.83	68.59	17.33	6.93	275.2	181.08	94.11	276.47	1.28	95.39
Hitomebore	75.5	0.15	75.48	18.56	6.9	292.33	186.22	106.11	264.42	-27.91	78.2
Baekjinju1	76.63	0.1	76.62	8.75	7.82	231.28	110.11	121.17	151.72	-79.56	41.61
Seonong4	79.03	0.12	78.56	9.51	6.6	188.28	65.2	123.08	93.53	-94.75	28.33
Onnuri	77	-0.05	76.62	18.82	7.51	229.36	144.75	84.61	231.14	1.78	86.39
Manmi	76.6	-0.1	76.4	13.33	7.88	242	136.5	105.5	204.83	-37.17	68.33
Giho	75.5	-0.4	75.94	18.64	6.81	234.28	144.53	89.75	237.25	2.97	92.72
Geuman	80	0.2	80.14	19.83	7.22	255.75	149.75	106	246.69	-9.06	96.94
Nakdong	76.9	-0.25	76.94	19.83	6.7	228.55	134.94	93.61	226.83	-1.72	91.89
Hexi41	63.77	-1.2	63.76	17.6	6.02	181.89	142.05	39.83	205.56	23.67	63.51
Samdeok	76.33	-0.54	76.94	18.56	7.01	239.83	139.53	100.3	218.17	-21.67	78.64

^aThe value is presented as a Rapid Visco Unit (RVU).

P, palatability value; ST, palatability score from sensory test; AC, amylose content; PC, protein content; CPV, cold paste viscosity; BDV, breakdown viscosity; PV, peak viscosity; HPV, hot paste viscosity; SBV, setback viscosity; CTV, consistency viscosity; M, palatability value estimated from the equation based on marker data, RVU, Rapid Visco Unit.

ns, non significant at 5% level; ** and *, significant at 1% and 5 % level, respectively.

표 1-7. 22 자포니카 식미와 관련 형질들간의 상관

parameter	AC	P	ST	PC	CPV	BDV	PV	HPV	SBV	CTV
P	0.18ns									
ST	0.06ns	0.85**								
PC	-0.48*	-0.43*	-0.24ns							
CPV	0.74**	-0.14ns	-0.12 ns	-0.17ns						
BDV	-0.46*	0.12ns	0.23 ns	0.40ns	-0.44*					
PV	0.22ns	-0.14ns	0.02 ns	0.18ns	0.67**	0.25ns				
HPV	0.52*	-0.21ns	-0.14 ns	-0.11ns	0.92**	-0.45*	0.75**			
SBV	0.79**	-0.07ns	-0.18 ns	-0.39ns	0.74**	-0.83**	-0.01ns	0.56**		
CTV	0.82**	0.02ns	-0.04 ns	-0.20ns	0.75**	0.25ns	0.28ns	0.43*	0.75**	
M	0.19ns	1.00**	0.85**	-0.43*	-0.14ns	0.11ns	-0.14ns	-0.21ns	-0.06ns	0.03ns

(3) 22개 자포니카 품종의 분자 마커 검정 결과

(가) 22개 품종에 대한 마커 분석

마커들을 이용 식미가 다양한 22개 품종들의 genomic DNA를 21개의 기존 마커와 새로 개발한 9개의 마커로 검정한 결과를 binary form으로 나타내었다 (표 1-8, 1-9). 총 30개의 마커 검정결과를 가지고 품종간 유연관계를 clustering하면 (그림 1-1) 식미와는 관련이 없이 단지 육성계보만을 추정할 수 있는 결과만 제공된다. 따라서 이 마커 검정결과를 마커를 각각의 변수로 하는 다중회귀 추정에 이용하였다.

표 1-8. 22개 자포니카 품종을 기 발표된 식미 관련 마커로 검정한 결과

No	Cultivar	Otsubo et al. (2002, 2003, 2007)															
		A6	A7	B1	B43	E30	F6	G4	G22	G28	J6	M2CG	M11	P5	S13	T16	WK9
1	Koshihikari	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
2	Kopum	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
3	Samgwang	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
4	Ilpum	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5	Chucheong	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
6	Dongjin	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
7	Sinkemo	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
8	Hwaseong	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
9	Hwacheong	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
10	Dobong	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
11	Samnam	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12	Palkong	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
13	Hitomebore	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1
14	Bekjinju1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
15	Seonong4	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
16	Onnuri	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
17	Manmi	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
18	Giho	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
19	Geman	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
20	Nakdong	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
21	Hexi41	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
22	Samdeok	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0

No	Cultivar	Bao et al. (2006b)	Crop molecular breeding lab.							
		SSIIa ^{a)}	TreB-1 ^{b)}	S3cII ^{c)}	S3cI ^{d)}	Am-s ^{e)}	GPA-s ^{f)}	GBSSI ^{g)} -s	AcPh ^{h)} -397	SH-51 ⁱ⁾
1	Koshihikari	1	0	1	1	0	1	0	1	0
2	Kopum	1	1	0	0	1	1	1	0	1
3	Samgwang	1	0	1	1	1	1	1	0	1
4	Ilpum	0	0	1	1	1	1	1	1	1
5	Chucheong	0	1	0	0	1	1	1	1	1
6	Dongjin	1	1	0	0	1	0	1	1	1
7	Sinkemo	0	0	1	1	1	1	1	1	1
8	Hwaseong	1	1	0	0	1	0	1	1	1
9	Hwacheong	0	1	0	0	1	1	1	1	1
10	Dobong	1	0	1	1	1	1	1	1	1
11	Samnam	0	0	1	1	1	1	1	1	1
12	Palkong	1	0	1	1	1	1	1	1	1
13	Hitomebore	0	0	1	1	1	1	1	1	1
14	Bekjinju1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
15	Seonong4	1	0	1	1	1	1	1	0	1
16	Onnuri	0	0	1	1	1	1	1	0	1
17	Manmi	0	0	1	1	1	1	1	1	1
18	Giho	0	0	1	1	1	1	1	1	1
19	Geman	0	0	1	1	1	1	1	1	1
20	Nakdong	1	0	1	1	1	0	1	1	1
21	Hexi41	0	1	0	0	1	1	1	1	1
22	Samdeok	1	1	0	0	1	1	1	0	1

표 1-9. 새로 개발한 9개의 마커로 식미가 다양한 22개 자포니카 품종의 유전자형 분석 결과

variety	binary data of each primer									
	SSIIa	TreB	S3cII	S3cI	AMs	GPA	GBSSI	AcPh	SH51	CBG
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)
Koshihikari	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1
Gopum	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1
Samgwang	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
Ilpum	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Chucheong	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
Dongjin	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Sinkeumo	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Hwaseong	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Hwacheong	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
Dobong	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Samnam	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Palkong	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0
Hitomebore	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Baekjinju1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Seonong4	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
Onnuri	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1

Manmi	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Giho	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Geuman	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Nakdong	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Hexi41	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
Samdeok	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1

(a), TT:GGTTTC (0) and GC:GGGCTC (1) at nt 4329-4330 (exon); (b), insertion of CTTT (0) and no insertion (1) at nt 79-82 of consensus region (intron); (c), point mutation from T (1) to G allele (0) at nt 1454 of consensus region (intron); (d), no deletion (1) and deletion (CTC) (0) at nt 1255-1257 of consensus region (intron); (e), (CT)31 (1) and (CT)27 (0); (f), (CT)26 (0) and (CT)11 (1); (g), (CT)18 (1) and (CT)17 (0); (h), point mutation from T (1) to G allele (0) at nt 397 of consensus region (intron); (i), point mutation from A (0) to T allele (1) at nt 51 (intron); (j), (CTT)19 (1) and (CTT)8 (0).

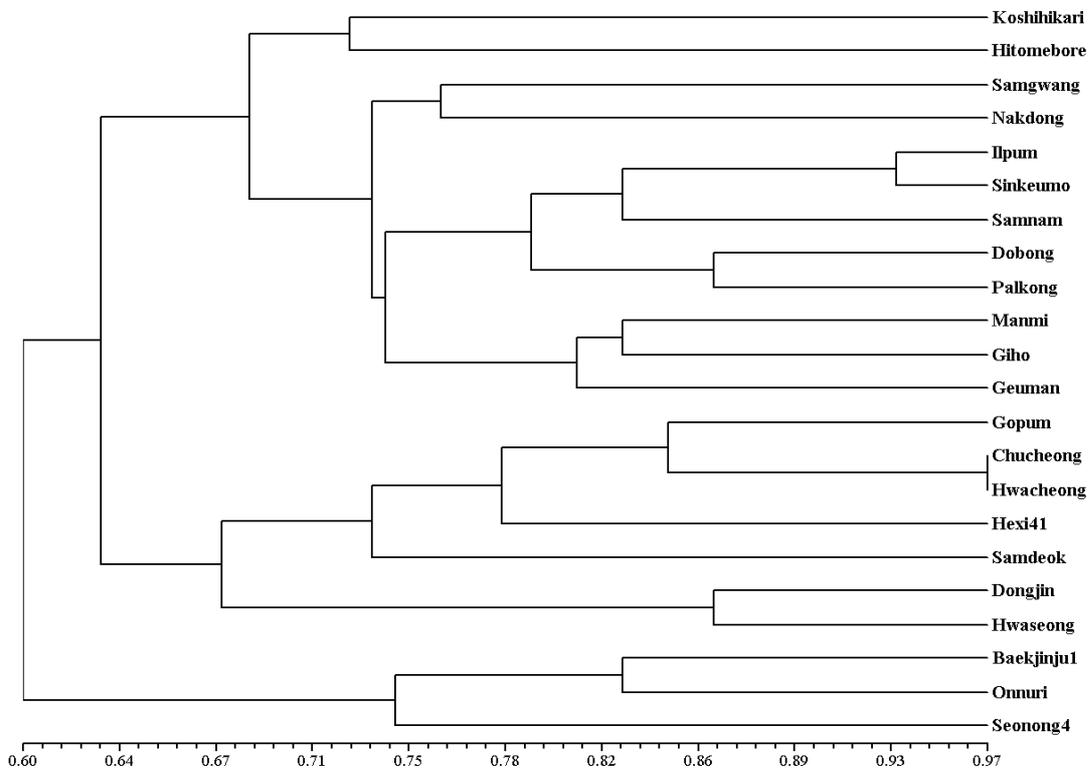


그림 1-1. 30개의 마커로 22개의 식미가 다양한 자포니카 품종을 검정하여 NTSYS로 군집분석한 결과

(나) 마커 분석결과를 이용한 식미 관련 형질 추정

식미와 관련 형질들을 마커 분석 결과로 추정하기 위하여 편회귀를 이용 유의성을 검정하고, 추정식을 작성하였다 (표 1-10). 이 추정식에 의하면 13개 마커를 이용하면 99%의 정확도로 토요식미기로 측정한 식미를 추정할 수 있는 것으로 나타났다. 또한 14개의 마커를 사용하면 관능검정 식미치를 99% 추정할 수 있는 것으로 나타났다. 토요식미치와 관능검정치를 동시

에 추정할 수 있는 마커는 9개로서 결정계수(R^2)의 대부분을 차지한다. 즉 식미추정치와 그의 변수가 되는 마커는 상당한 결정력을 가지고 식미를 추정할 수 있음을 의미한다. 이 추정식의 유용성을 검증하기 위하여 식량과학원에서 육성한 32개의 지적계통에 대해 토요식미기로 식미 검정한 결과와 32개 계통을 마커 유전자형으로 검정한 후 추정식에 의해 각 계통의 마커추정 식 식미치를 구하였다 (표 1-11). 토요식미치와 마커추정치와의 상관관계를 보면 $r=0.845^{**}$ (그림 2)로 매우 유의하게 나타났다. 즉 임의의 육성계통도 마커검정에 의해 식미를 추정할 수 있다는 결과가 된다. 식미가 우수한 품종을 육성할 때 초기세대에서 MAS로 마커를 활용하면 육성효율을 높일 수 있을 것이다. 이 자료는 논문으로 발표되었고(Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57,2754-2762), 특허를 출원하였다(특허청 10-2009-0010299).

표 1-10. 유의성있는 마커의 유전자형을 사용하여 식미추정 다중 회귀식을 구한 결과

PCR primer	palatability by Toyo taste meter (P)			palatability by sensory test (ST)		
	parameter estimate	t value	R^2	parameter estimate	t value	R^2
G4	-16.97 ± 1.19	-14.22 **	0.087	-1.20 ± 0.06	-21.77 **	0.212
M11	-1.94 ± 0.60	-3.25 **	0.096	-0.14 ± 0.03	-5.03 **	0.010
E30	26.55 ± 0.83	32.12 **	0.104	0.86 ± 0.04	19.62 **	0.059
M2CG	-2.40 ± 0.56	-4.33 **	0.060	-0.38 ± 0.03	-15.21 **	0.041
GPA	-21.14 ± 1.11	-19.12 **	0.129	-0.82 ± 0.05	-17.28 **	0.021
S3cl	-1.62 ± 0.62	-2.60 *	0.017	-0.38 ± 0.03	-13.41 **	0.005
P5	19.01 ± 1.32	14.44 **	0.307	1.09 ± 0.04	26.81 **	0.288
B1	6.42 ± 0.77	8.30 **	0.047	0.41 ± 0.03	12.90 **	0.015
CBG	13.45 ± 1.11	12.12 **	0.087	0.68 ± 0.07	10.27 **	0.228
J6	3.87 ± 0.74	5.21 **	0.083			
WK9	2.62 ± 0.59	4.42 **	0.003			
A7	-12.33 ± 1.27	-9.72 **	0.031			
AMs	-8.72 ± 1.56	-5.58 **	0.021			
G81				0.27 ± 0.03	10.41 **	0.021
F6				0.32 ± 0.03	10.36 **	0.033
SSIIa				-0.27 ± 0.03	-8.06 **	0.001
G28				0.33 ± 0.04	8.81 **	0.005
AcPh				-0.48 ± 0.04	-11.44 **	0.060
intercept	76.66 ± 2.71	28.29 **		-0.54 ± 0.11	-4.74 **	
total			0.990			0.990
eq	$Y = 76.66 - 16.97(G4) - 1.94(M11) + 26.55(E30) - 2.40(M2CG) - 21.14(GPA) - 1.62(S3cl) + 19.01(P5) + 6.42(B1) + 13.45(CBG) + 3.87(J6) + 2.62(WK9) - 12.33(A7) - 8.72(Ams)$			$Y = -0.54 - 1.20(G4) - 0.14(M11) + 0.86(E30) - 0.38(M2CG) - 0.82(GPA) - 0.38(S3cl) + 1.09(P5) + 0.41(B1) + 0.68(CBG) + 0.27(G81) + 0.32(F6) - 0.27(SSIIa) + 0.33(G28) - 0.48(AcPh)$		

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

표 1-11. 32개의 육성계통과 3개의 대조품종에 대한 토요식미치와 마커에 의한 추정식미치

breeding line/variety	palatability	
	Toyo taste meter (P)	regression eq (M)
Suweon503	72.40	72.93
Suweon507	80.51	79.34
Suweon508	76.40	76.94
Suweon509	73.21	75.55
Suweon510	72.02	75.55
Suweon511	78.51	79.56
Suweon513	66.32	68.69
Suweon514	68.79	73.76
Suweon515	66.02	75.38
Suweon516	79.81	81.79
Suweon518	64.80	67.35
Nampyeong ^a	76.18	81.87
Iksan486	86.71	94.32
Iksan488	76.89	75.47
Iksan490	78.51	84.89
Iksan493	76.60	74.61
Iksan494	73.62	73.07
Iksan495	79.02	80.92
Iksan496	71.67	75.32
Iksan497	72.11	74.61
Iksan502	71.32	78.13
Iksan504	65.58	68.91
Keumo ^a	63.53	72.06
Juan ^a	77.41	73.07
Milyang211	70.90	75.83
Milyang215	59.81	60.10
Milyang218	70.02	73.15
Milyang219	74.58	81.65
Milyang220	64.31	58.20
Milyang222	60.52	72.06
Milyang223	62.80	68.34
Milyang224	61.00	61.93
Milyang230	78.60	79.16
Milyang231	66.41	69.31
Milyang232	67.03	64.52

^a Three check varieties.

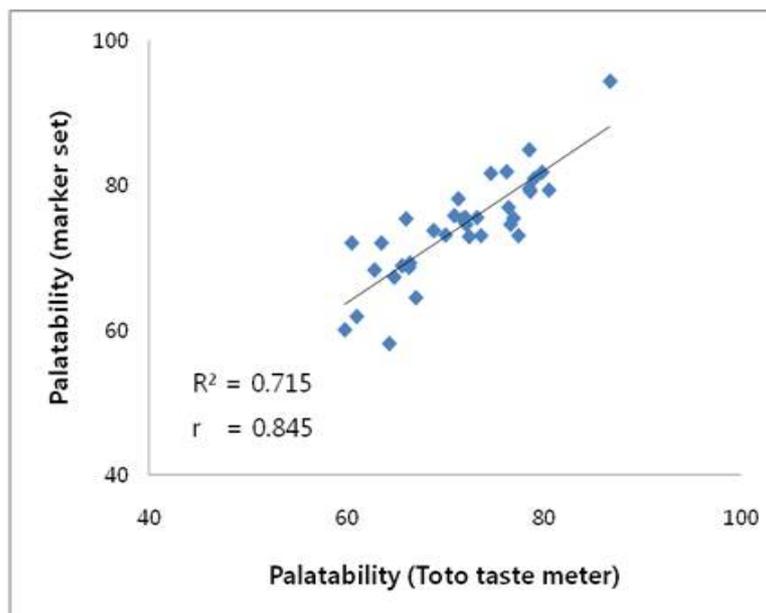


그림1-2. 32개 육성계통의 토요식미치와 마커로 검정한 식미치와의 상관

(4) 계통 육성 및 분석집단 양성

(가) RIL 및 육성 계통에 대한 식미 분석

고시히카리/삼남 조합의 F9 396개 RIL을 수확하여 355개 계통의 식미를 검정하였다(그림 1-3). 이들 계통들의 식미치는 양친의 범위를 벗어나는 초월분리를 보였으며, 이들 중 고시히카리보다 우수한 식미를 가진 계통들을 다수 선발하였다(표1-12) .

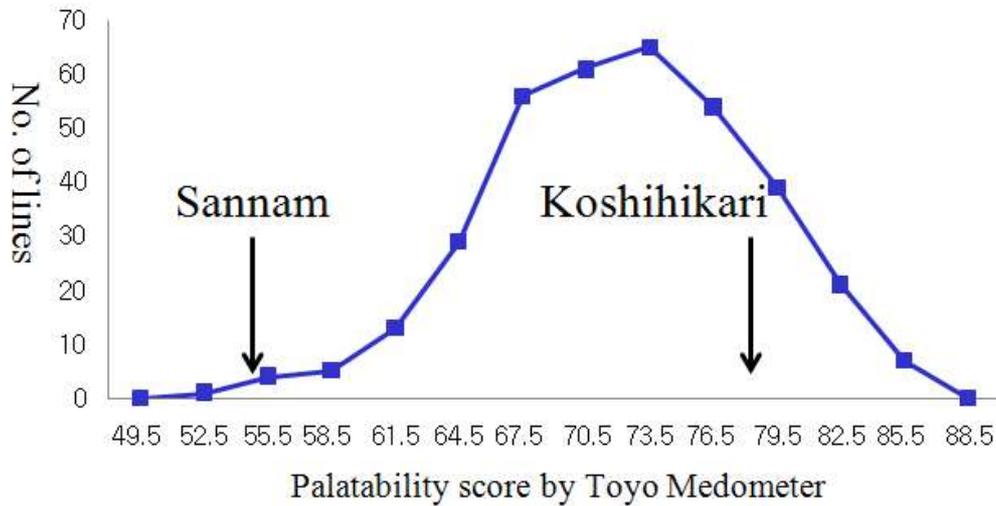


그림 1-3. 삼남/고시히카리 조합 F9 355 RIL계통의 토요식미치(윤기치) 검정

표 1-12. 고시히카리/삼남 조합의 RILs 계통에서 식미가 우수하여 선발한 것들

RIL 계통 번호	분자마커 식미치	토요식미치
고시히카리/삼남 F9-321	98.37	84.8
고시히카리/삼남 F9-58	96.42	83.5
고시히카리/삼남 F9-34	94.93	85.1
고시히카리/삼남 F9-43	92.05	86.2
고시히카리/삼남 F9-346	92.05	83.6
고시히카리/삼남 F9-167	92.05	82.9
고시히카리/삼남 F9-335	92.4	85.8
고시히카리/삼남 F9-117	91.59	83.1
고시히카리/삼남 F9-18	90.93	81.8
고시히카리/삼남 F9-118	89.65	83.1
고시히카리	84	77.9
삼남벼	65	55.1

(나) 돌연변이 집단 양성

일품벼와 고시히카리에 EMS를 처리한 M3 종자를 수확하여 NIRS 다중 파장대에서 변이

계통들을 일품벼에서 173개, 고시히까리에서 143개 선발하였다. 그들을 토요 식미기로 윤기치를 검정하여 다수의 계통들을 선발하였다. 이 계통들을 포장에 재배하여 농업형질들이 정상인 계통들만 수확하였다. 이들 계통들의 식미 변화 요인들을 분석중이다.

표 1-13. 고시히까리와 일품벼 돌연변이 계통중 식미가 증진되거나 유의하게 저하된 계통들의 식미치

Mutant lines(koshihikari)	Toyo score	Mutant lines(Ilpum)	Toyo score
810055	80.1	710036	82.6
810057	71.3	710059	83
810142	70	710236	82.5
810172	82.5	710376	76.1
810176	83.3	710378	83.1
810265	72	710442	74
810267	81.1	710447	83.1
810280	71.5	710478	83.2
810341	70.2	710480	83.8
810445	67.2	710526	83.6
810451	66.9	710628	84.7
810456	69.6	710692	72.7
810482	70.2	710743	84.3
810596	81.2	710757	82.4
810619	66.3	710768	73.2
810770	71.2	710783	72.9
810836	81.9	710792	72.1
810857	66	710804	83.3
810920	84.7	710830	71.4
		710949	82.8
Kohshihikari	83.9	710955	66.8
		710958	82.7
		710967	82.7
		Ilpum	83.0

나. 인디카 벼의 식미 평가 및 선발 표지 개발

(1) 식미가 다양한 24개 인디카 품종의 식미 및 관련특성 검정

식미가 다양한 24개 인디카 품종(인도네시아산)의 식미 관련 특성을 측정하였으며 결과 식미치와 기타 아밀로그램 성은 자포니카와 유사한 경향을 보였다(표 1-14, 1-15).

표 1-14. 24개 인디카카 품종의 식미 관능검정치, 아밀로스, 단백질 함량 및 아밀로그램 특성

variety	ST	AC	PC	PV	HPV	BDV	CPV	SBV	CTV
	(1~5)	(%)	(%)	(RVU)	(RVU)	(RVU)	(RVU)	(RVU)	(RVU)
Rojolele	4.1	22.53	9.73	245	139.53	105.47	271.08	26.08	131.55
Ciliwung	3.9	18.72	8.67	265.41	156.42	109	296.03	30.61	139.61
Cisokan	3.45	21.89	7.72	138.78	91	47.13	235.18	96.53	144.18
Cibodas	3.6	23.42	8.03	160.72	109.09	51.64	256.47	95.75	147.39

Jatiluhur	2.2	24.21	5.53	225.5	150.86	74.64	323.31	97.8	172.45
Kalimutu	3.6	23.04	6.17	198.33	114.75	83.58	234.55	36.22	119.8
Cirata	3.4	20.41	9.25	233.89	114.64	116.06	221.31	-9.39	106.67
Memberamo	4.1	19	10.22	245.19	147.31	97.89	266	20.8	118.69
Ciherang	3.95	18.31	9.71	237.92	119.33	118.58	230.14	-7.78	110.8
Sintanur	3.1	16.63	6.43	204.78	111.03	93.75	162.08	-42.69	51.06
Cimelati	4.05	18.16	10.23	229	129.22	99.78	240.61	11.61	111.39
Maros	3.1	22.88	9.73	203.39	108.97	94.42	250.78	47.39	141.8
Singkil	2.95	21.25	9.93	244.75	165.69	79.06	310.55	65.81	144.86
Batanghari	3.8	21.35	8.43	295.03	151.44	143.58	279.61	-15.42	128.17
Conde	4	21.48	9.07	207.55	119.83	87.72	258.08	50.53	138.25
Angke	3.9	21.3	10.14	202.25	113.92	88.34	229.25	27	115.33
Batang Gadis	4	20.87	10.33	198.31	125.14	73.17	261.97	63.67	136.83
Batang Piaman	3.4	24.11	8.01	255.5	144.69	110.81	280.39	24.89	135.69
Cigeulis	3.35	19.1	9.19	252.36	126.14	126.22	246.47	-5.89	120.34
Fatmawati	3.8	20.97	9.75	241.97	136.19	105.78	266.08	24.11	129.89
Konawe	3.05	20.66	9.74	215.06	116.33	98.72	241.11	26.06	124.78
Logawa	3.25	24.59	6.93	124.16	91.25	32.91	209.91	85.75	118.66
Pepe	4.25	21.76	9.78	202.72	131.41	71.31	258.03	55.31	126.62
Tukad Balian	4.15	26.51	9.57	224.03	132.47	91.56	296.11	72.08	163.64

P, palatability value; ST, palatability score from sensory test; AC, amylose content; PC, protein content; CPV, cold paste viscosity; BDV, breakdown viscosity; PV, peak viscosity; HPV, hot paste viscosity; SBV, setback viscosity; CTV, consistency viscosity; M, palatability value estimated from the equation based on marker data, RVU, Rapid Visco Unit.

표 1-15. 식미와 관련 형질들간의 상관

parameter	ST	AC	PC	PV	HPV	BDV	CPV	SBV
ST								
AC	-0.15ns							
PC	0.58**	-0.26ns						
PV	0.14ns	-0.31ns	0.31ns					
HPV	0.045*	-0.07ns	0.20ns	0.82**				
BDV	0.19ns	-0.42*	0.32ns	0.90**	0.49*			
CPV	-0.04ns	0.42*	0.14ns	0.46*	0.77**	0.12ns		
SBV	-0.18ns	0.70**	-0.19ns	-0.60**	-0.13ns	-0.81**	0.43*	
CTV	-0.09 ^{ns}	0.69**	0.04 ^{ns}	0 ^{ns}	0.31 _{ns}	-0.23 ^{ns}	0.84**	0.76**

(2) 24개 인디카 품종의 식미 관련 마커 검정 결과

(가) 24개 인디카 품종에 대한 마커 분석

마커 다양성 검정을 통하여 기존에 발표된 식미관련 마커 16개와 새로 개발한 마커 14개에서 다양성을 나타내었으며 선발된 총 30개의 마커를 이용하여 식미가 다양한 24개 인디카 품종들의 genomic DNA를 PCR하여 binary form으로 나타내었다(표1-16, 1-17). 인디카 품종간 유연관계를 clustering한 결과 매우 다양한 패턴을 보였다(그림 1-4).

표 1-16. 24개 인디카 품종을 기 발표된 식미 관련 마커 18개로 검정한 결과

variety	A7 ^a	E30 ^a	F6 ^a	G4 ^a	G28 ^a	S13 ^a	T16 ^a	WK9 ^a	P3 ^a	Isa ^b	SS1 ^c	Sbe3 ^d	P3A ^e	P4 ^f	P7 ^g	Pul3 ^h
Rojolele	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
Ciliwung	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
Cisokan	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Cibodas	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Jatiluhur	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
Kalimutu	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
Cirata	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Memberamo	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
Ciherang	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Sintanur	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
Cimelati	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
Maros	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
Singkil	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Batanghari	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
Conde	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
Angke	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
Batang Gadis	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Batang Piaman	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
Cigeulis	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
Fatmawati	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Konawe	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
Logawa	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
Pepe	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Tukad Balian	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1

^apresence (1), absence (0); ^bfragment of 230bp(0), 220bp(1); ^cNo insertion(1), insertion (0); ^d allele of C(1), allele of G(0); ^efragment of 268bp(1), 278bp(0); ^ffragment of 139bp(0),153bp(1); ^gfragment of 171bp(1), 195bp(0); ^hfragment of 297bp(1), 281bp(0).

표 1-17. 24개 인디카 품종을 새로 개발한 식미 관련 마커 14개로 검정한 결과

variety	TreB ^a	AMs ^b	GPA ^c	AcPh ^d	S3cl ^e	S3ClI ^f	GBSS1 ^g	PP2 ^h	PFruc ⁱ	Aglu ^j	LDS ^k	BE3 ^l	CBG ^m	HP ⁿ
Rojolele	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
Ciliwung	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
Cisokan	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
Cibodas	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
Jatiluhur	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Kalimutu	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Cirata	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
Memberamo	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
Ciherang	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
Sintanur	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
Cimelati	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
Maros	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
Singkil	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
Batanghari	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Conde	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
Angke	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Batang Gadis	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Batang Piaman	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
Cigeulis	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
Fatmawati	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
Konawe	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Logawa	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Pepe	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
Tukad Balian	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1

^a Insertion of CTTT (1) and no insertion (0) at nt 79-82 of consensus region (intron); ^b (CT)31 and other (CT) repeat (1) and (CT)27 (0) ^c (CT)26 (0) and (CT)11 (1) ^d Point mutation from T (1) to G allele (0) at nt 397 of consensus region (intron) ^e No deletion (1) and deletion (CTC) (0) at nt 1255-1257 of consensus region (intron) ^f Point mutation from T (1) to G allele (0) at nt 1454 of consensus region (intron). ^g (CT)18 (1) and (CT)17 (0) ^h Point mutation from G(1) to A(0); ⁱPoint mutation from A(0) to G(1); ^j fragment of 231bp(0), 250bp(1); ^k fragment of 191bp(0),204(1); ^lPoint mutation from C(0) to G(1); ^m (CTT)19 (1) and other (CTT) repeat (0) ⁿfragment of 296bp(1), other size (0).

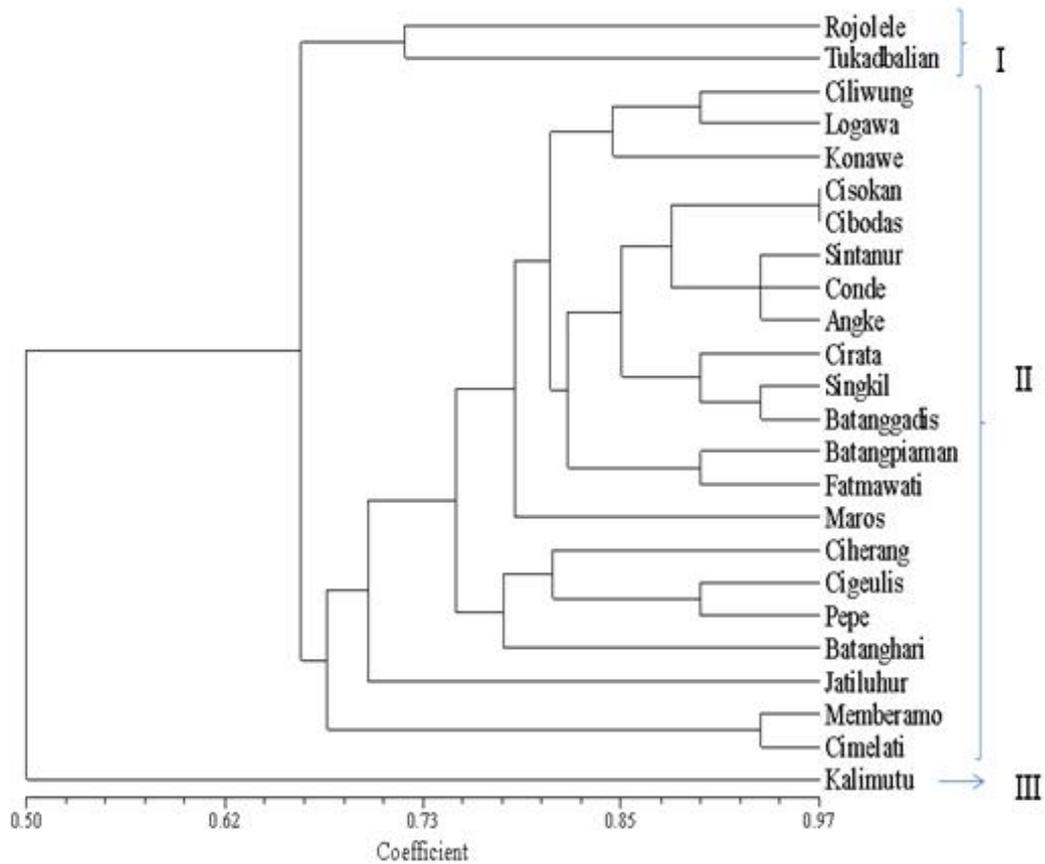


그림 1-4. 30개의 마커로 24개 식미가 다양한 인다가 품종을 검정하여 NTSYS로 군집분석한 결과

(나) 마커 분석결과를 이용한 식미 관련 형질 추정

식미와 관련 형질들을 마커 분석 결과로 추정하기 위하여 자포니카 벼에서와 같이 편회귀를 이용 유의성을 검정하고, 추정식을 작성하였다(표 1-18). 이 추정식에 의하면 18개의 마커를 이용하면 99.7%의 정확도로 관능검정 식미치를 추정할 수 있는 것으로 나타났다. 18의 마커 중에는 새로 개발한 6개의 마커가 포함되었다.

표 1-18. 유의성있는 마커의 유전자형을 사용하여 식미추정 다중회귀식을 구한 결과

PCR primer	Palatability by sensory test (ST)		
	parameter estimated	t-value	R ²
A7	-3.05	-15.85**	0.074
E30	-0.28	-6.78**	0.045
F6	0.65 ± 0.05	13.76**	0.029
S13	0.13 ± 0.04	3.20*	0.01
T16	6.11 ± 0.25	24.27**	0.029
WK9	1.00 ± 0.06	16.69**	0.048
P3	-0.2	-6.58**	0.01
GPA	2.36 ± 0.11	22.23**	0.32
AcPh	0.27 ± 0.04	5.91**	0.048

Pul3	1.62 ± 0.08	18.92**	0.001
CBG	-0.8	-18.27**	0.06
S3cI	-0.46	-7.45**	0.01
GBSS1	0.42 ± 0.04	10.01**	0.00001
SS1	-3.05	-21.80**	0.167
Sbe3	-0.47	-9.69**	0.012
P3A	0.45 ± 0.07	6.48**	0.008
P4	0.97 ± 0.08	11.65**	0.032
HP	-0.75	-13.90**	0.094
Intercept	3.07 ± 0.12	26.49**	
Total			0.997
Equation	$Y = 3.07 - 3.26(A7) - 0.33(E30) + 0.65(F6) + 0.13(S13) + 6.11(T16) + 1.00(WK9) - 0.23(P3) + 2.36(GPA) + 0.27(AcPh) + 1.62(Pul3) - 0.85(CBG) - 0.53(S3cI) + 0.42(GBSS1) - 3.20(SS1) - 0.52(Sbe3) + 0.45(P3A) + 0.97(P4) - 0.81(HP)$		

다. 중국 운남 벼 품종과 한국 벼 품종의 미질비교 및 원인분석

중국 운남 벼 품종과 한국 벼 품종의 미질비교 및 원인 분석 : 한국의 대표적인 9개 품종과 운남의 11개 품종을 선정해서 미질특성을 비교하였다. 가장 현저하게 차이가 났던 형질은 단백질 함량이었으며 그와 관련된 아밀로그래 특성에도 차이가 있었다. 분석결과 단백질함량이 양국의 쌀 식미 차이를 유발하는 주요 요인으로 판정되었으며 (표1-19, 1-20), 미질 성분 구성요소에 의한 식미추정식도 구하였다(표1-21).

표 1-19. 한국 품종과 중국 운남 품종의 미질특성 비교

	Origin	Palatability of cooked rice ¹⁾	Protein content (%)	ADV (1~7)	Amylose content (%)
Mean	Korea	76.4	5.95	6.64	18.71
	Yunnan	57.1	7.39	6.64	19.15
Range	Korea	70.7~80.8	5.11~6.76	6.47~6.77	16.69~20.19
	Yunnan	50.5~66.4	6.75~8.26	5.97~6.87	16.97~21.89
C.V. (%)	Korea	4.4	9.37	1.33	6.08
	Yunnan	8.5	6.64	4.00	6.46
T-test		**	**	ns	ns

1) 토요식미기로 측정한 값

표 1-20. 한국 품종과 중국 운남 품종의 아밀로그램 특성 비교

	Origin	PT	PAT	PKV	HPV	BDV	CPV	CSV	SBV
Mean	Korea	6.36	68.1	234.9	177.3	57.6	253.4	76.0	18.5
	Yunnan	6.45	68.1	201.8	168.4	33.4	241.6	73.2	39.8
Range	Korea	6.07- 6.58	68.0- 68.2	210.6- 276.9	143.8- 226.1	44.5- 76.6	232.2- 293.9	63.3- 94.1	9.3- 29.6
	Yunnan	6.11- 7.00	68.0- 68.6	155.6- 255.3	125.5- 232.3	23.0- 45.3	194.3- 296.0	55.4- 87.3	29.5- 48.0
C.V. (%)	Korea	2.36	0.1	9.1	13.1	20.9	7.9	12.8	40.0
	Yunnan	4.67	0.2	13.6	17.6	22.3	10.8	12.8	12.1
T-test		ns	ns	**	ns	**	ns	ns	**

PT: Peak time (min); PAT: Pasting initial temperature (°C); PKV: Peak viscosity; HPV: Hot paste viscosity; BDV: Breakdown viscosity (= PKV – HPV); CPV: Cool paste viscosity, SBV: Setback viscosity (= CPV – PKV); CSV: Consistency viscosity (= CPV – HPV).

** : Significant at $\alpha = 0.01$ by t-test. ns: Not significant at $\alpha = 0.05$ by t-test.

표 1-21. 한국품종과 중국 운남품종의 식미치에 대한 품질요소들의 편회귀분석 결과 및 식미추정식

Traits	All traits			Traits correlated with PV			Significant trait		
	Estimate	t value	R ²	Estimate	t value	R ²	Estimate	t value	R ²
PC	-7.907	-2.81**	0.441	-7.314	-3.75**	0.501	-10.865	-9.11**	0.822
SBV	-169.825	-0.79	0.058	-41.959	-0.90	0.055			
CPV	189.719	0.64	0.039	41.624	0.89	0.054			
PKV	-152.385	-0.54	0.028	-41.592	-0.89	0.054			
BDV	-17.142	-0.07	0.000	-0.047	-0.42	0.013			
AC	-1.371	-0.94	0.082						
HPV	-37.362	-0.41	0.016						
CSV	-20.283	-0.11	0.001						
ADV	-0.094	-0.01	0.000						
Intercept	166.623	2.02*		120.437	5.04**		139.024	17.16**	
Total R ²			0.900			0.888			0.822

* : Significance at $P < 0.05$. ** : Significance at $P < 0.01$. Refer to Table 3 and Table 4 for abbreviations.

라. Sucrose synthase 3 유전자의 haplotype 분석

QTL 분석 결과 식미와 관련이 있는 것으로 추정된 Sucrose synthase 3 유전자(그림 1-5)의 haplotype을 분석하였다. 35개의 재배품종과 *O. rufipogon*을 포함하는 8개의 야생종에 대해 haplotype을 분석한 결과 요약은 표 1-22에 나타나 있다. 이 분석결과를 이용하여 품종간 군집 분석한 결과는 그림 1-6에 제시하였다. 43개의 품종 및 계통들은 2개의 큰 group으로 구분되었는데 전체적으로는 11개의 haplotype group으로 구분할 수 있었으며, 그들간 진화적 거리를 추정할 수 있었다(표 1-23). *O. rufipogon*은 인디카형과 자포니카형 group에 모두 존재하여 아종의 분화가 이미 *O. rufipogon*에서부터 시발되었음을 보여주고 있다.

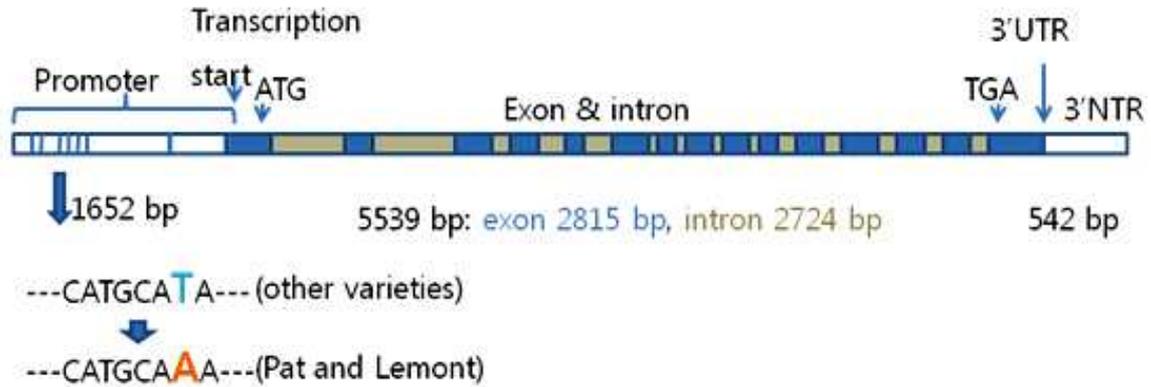


그림 1-5. sucrose synthase 3 유전자의 구조

표 1-22. 43개 품종에 대한 Sucrose synthase 3 유전자 haplotype 분석 결과 요약

Parameter	Value	Remarks
Promoter		
Total length of amplicons (bp)	1652	1 per 20.1 bp
Number of all sequence variants (SNPs and indels)	82	
Frequency of all sequence variants	0.096	
Transcript (including intron)		
Total length of amplicons (bp)	5539	2815 bp exon, 2724 bp intron
Number of all sequence variants (SNPs and indels)	150	1 per 36.9 bp
Number of nucleotide substitutions	35	
Frequency of polymorphic sites per bp	0.006	1 per 158.3 bp
Frequency of polymorphic sites per bp (coding)	0.005	1 per 216.5 bp
Frequency of polymorphic per bp (non-coding)	0.008	1 per 123.8 bp
Number of indels	115	
Overall indel frequency	0.021	1 per 48.2 bp
Frequency of indels per bp (coding)	0.005	1 per 201.1 bp
Frequency of indels per bp (non-coding)	0.037	1 per 27 bp
3'--downstream region		
Total length of amplicons (bp)	542	
Number of all sequence variants (SNPs and indels)	22	1 per 24.6 bp
Frequency of all sequence variants	0.041	
Total length		
Number of all sequence variants (SNPs and indels)	254	1 per 30.4 bp
Frequency of polymorphic sites per bp	0.007	1 per 135.7 bp
Overall indel frequency	0.025	1 per 39.2 bp
Overall transition/transversion ratio	2.59	

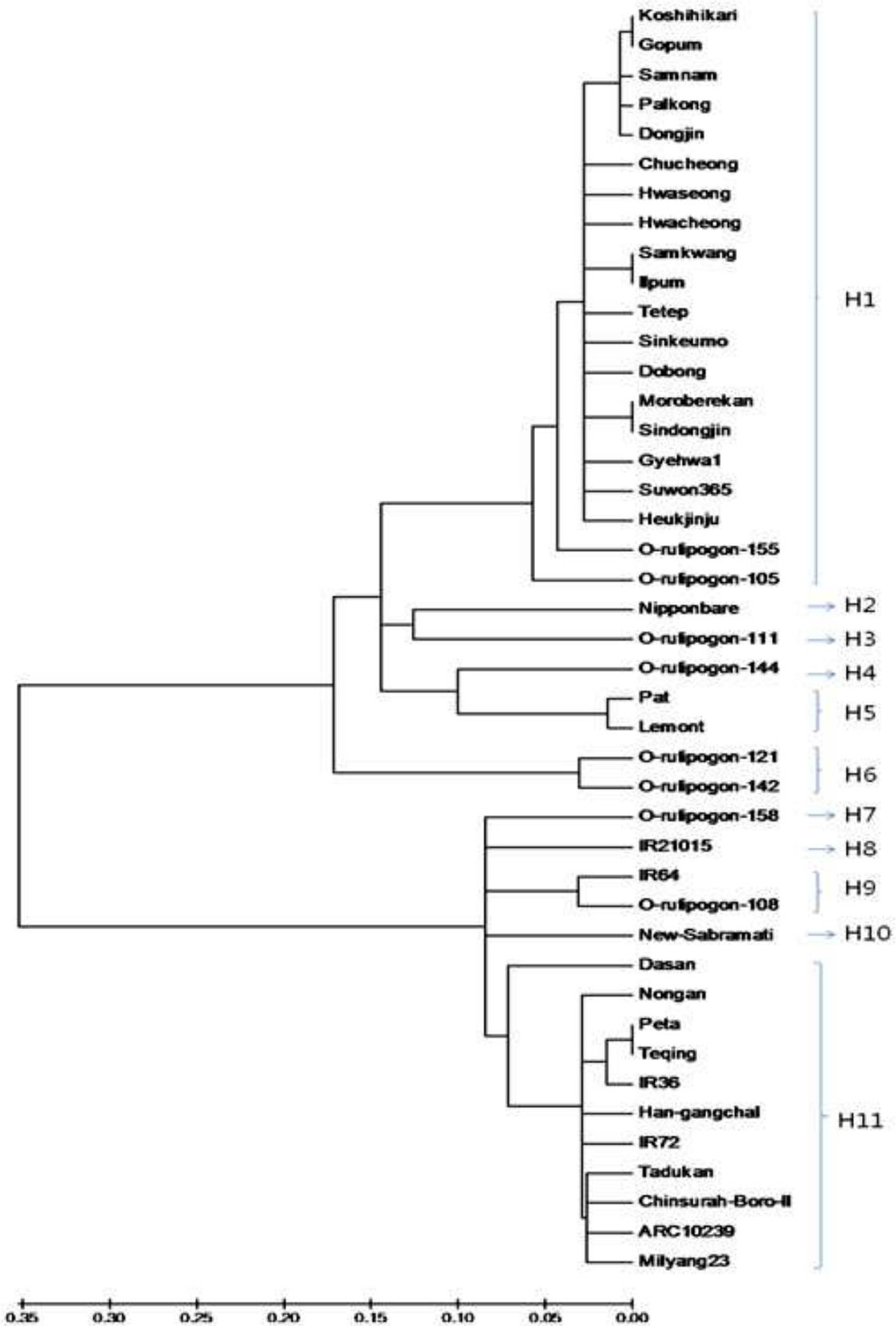


그림 1-6. sucrose synthase 3 유전자의 haplotype에 의한 품종간 유연관계 도해

표 1-23. sucrose synthase 3 유전자의 haplotype group 들 간의 진화적 거리

	H 1	H 2	H 3	H 4	H 5	H 6	H 7	H 8	H 9	H 10	H 11
H 1(20)	0.099										
H 2(1)	0.227	-									
H 3(1)	0.158	0.136	-								
H 4(1)	0.153	0.202	0.095	-							
H 5(2)	0.189	0.228	0.138	0.094	0.036						
H 6(2)	0.340	0.387	0.358	0.303	0.395	0.018					
H 7(1)	0.533	0.449	0.549	0.515	0.599	0.168	-				
H 8(1)	0.607	0.409	0.571	0.537	0.621	0.187	0.134	-			
H 9(2)	0.654	0.460	0.603	0.565	0.660	0.370	0.334	0.276	0.096		
H 10(1)	0.931	1.166	0.937	0.890	1.020	0.395	0.439	0.344	0.342	-	
H 11(11)	0.977	0.696	0.937	0.889	1.021	0.384	0.306	0.174	0.167	0.220	0.071

H:haplotype. Parenthesis indicates the number of varieties in each haplotype.

제2절 <제2세부과제> 저장 단백질 조성 및 함량 조절에 의한 벼 식미 증진

식미는 지방, 단백질, 탄수화물 등 다양한 요인에 의해서 결정되는데 고식미의 경우 일반적으로 단백질 함량이 낮은 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구는 저장단백질의 함량을 낮추어 식미 (eating quality)가 높은 신품종 벼를 생산하고자 하였다. 기존에 발표된 연구 결과 의하면 저장단백질인 albumin, globulin, glutelin 그리고 prolamin의 안정성이 PDI (protein disulfide isomerase), BIP (binding protein), REB (rice endosperm bZIP)에 의해서 조절되는 것으로 보고되었다. 따라서 이들 단백질을 코딩하는 유전자를 벼에서 분리하여 조직 특이성과 발달시기에 상관없이 상시 발현되는 CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 프로모터와 밀 (wheat)에서 동정되었으며 종자에서 발현이 특이적으로 되는 Tapuro b 프로모터를 사용하여 재조합 벡터를 구축하였다 (Figure 2-1).

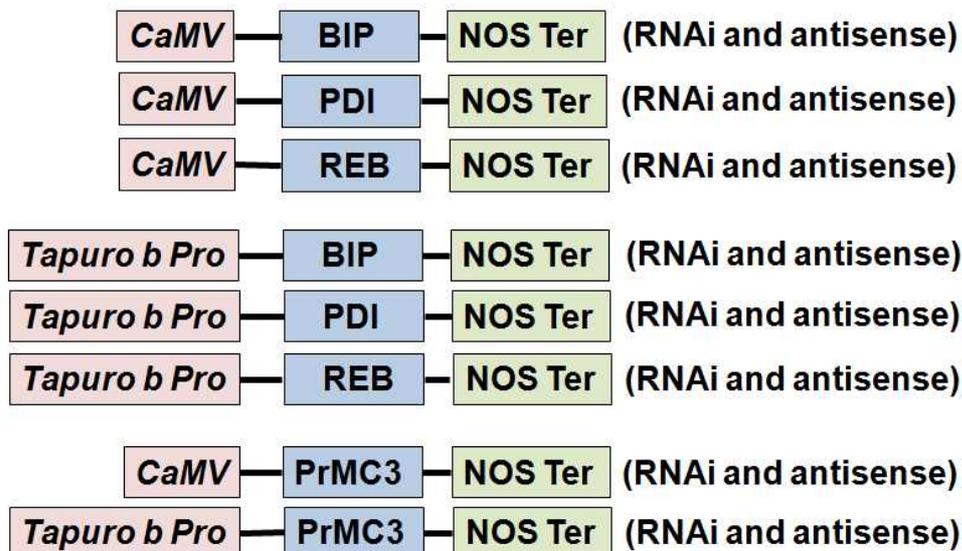


Figure 2-1. Construction of plant expression vector to down-regulate seed storage protein in rice. CaMV, cauliflower mosaic virus; Tapuro b pro, Wheat Tapuro b promoter; BIP, binding protein; PDI, protein disulfide isomerase; REB, rice endosperm bZIP; PrMC3, esterase/GA receptor.

아그로박테리아를 이용하여 이들 재조합 유전자를 고식미인 고품벼, 중식미인 화청벼 그리고 저식미인 도봉벼에 도입하였으며 각각의 유전자가 발현될 경우 RNAi형태나 antisense 형태로 발현되게 되며 이들이 형질전환체 식물내에서 만들어 질 경우 형질전환체의 경우 PDI, BIP, REB 단백질이 생산되지 않기 때문에 저장단백질의 구조가 비정상적으로 만들어지거나 안정성이 떨어져서 저장단백질의 함량이 감소할 것으로 기대하였다. 현재 3년째 세 번 연속 homozygote이면서 single copy가 삽입된 형질 전환체를 선별하여 마지막으로 종자분석을 시행하고 있다.

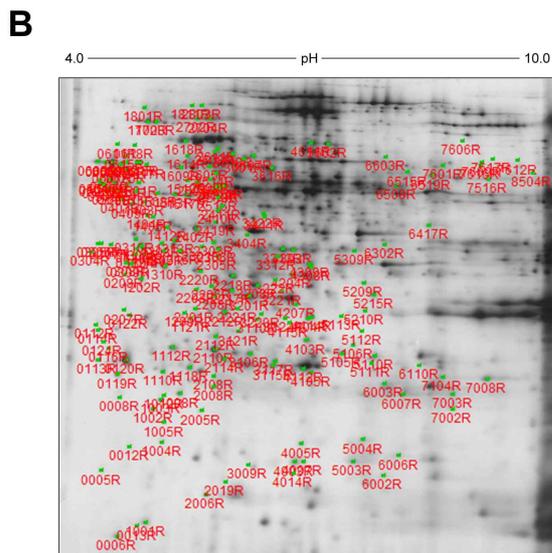
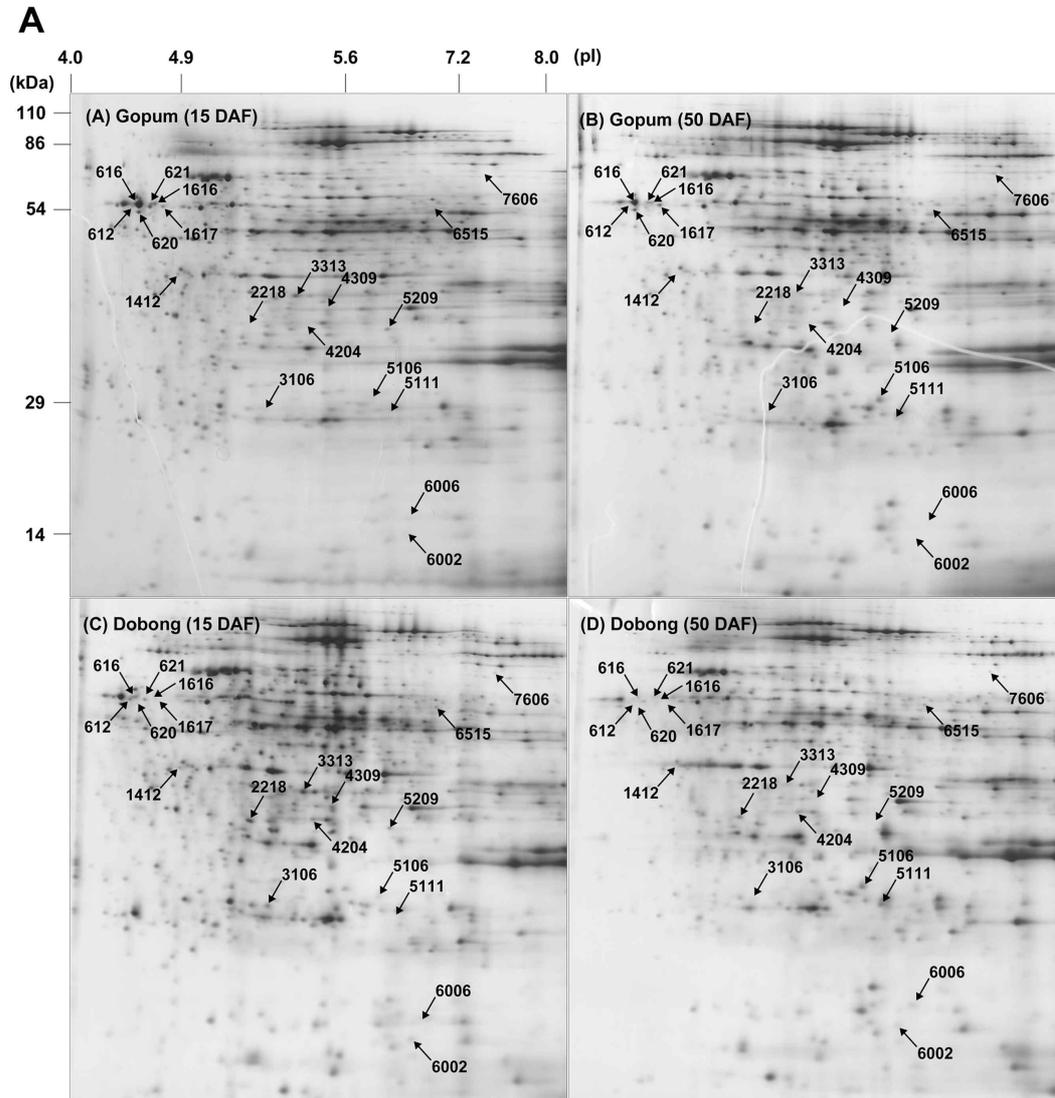


Figure 2-2. Comparison of the 2-DE patterns of seed proteins extracted from Gopumbyeo and Dobongbyeo at 15 and 50 DAF. Whole spikes were used to extract seed protein, and IEF were carried out with IPG dry strip (pH 4-10 Non-linear, 24cm length). 10-16% gradient SDS-PAGE was

used in the second dimension, and the separated gels were stained with silver nitrate. The experiment was repeated twice independently. (A) Arrow heads indicate the 15 selected proteins, whose intensity differed by more than five-fold between the two cultivars. (B) Fifty-three spots whose intensity differed by more than five-folds between the two cultivars were chosen.

Table 2-1. List of primers used in this study

Accession No.	Gene name	Amplicon size (bp)	Sequences (5'-3')
P41095	60S acidic ribosomal protein P0	207	[F] 5'-tatgacagtgggtcagtttcagc-3' [R] 5'-atggtggtagcagtagttcgggtc-3'
AP003525	Putative PrMC3	201	[F] 5'-tcatccggtctacgtgagcggcc-3' [R] 5'-cgcccggtggaagtacacgagga-3'
AP004464	Putative glycyl-tRNA synthetase	225	[F] 5'-agaacatgttgagggtgactgcc-3' [R] 5'-ccaggacagcaagaacatgcttca-3'
AY987391	Protein disulfide isomerase	201	[F] 5'-aacgatgtccaagcaggttcgat-3' [R] 5'-ttagactcatccttgagaggctc-3'
AB050724	Ascorbate peroxidase	216	[F] 5'-ctggcgtccaacctttgatctt-3' [R] 5'-tcctcagcaaatcccagttcagag-3'
AJ251899	S-adenosylmethionine decarboxylase 2	201	[F] 5'-ctcaggtatctctgacatcatccc-3' [R] 5'-accctcttgacaaggtcaccatag-3'
AP005002	S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase-like	209	[F] 5'-acgtgaaggtctacgaggacaat-3' [R] 5'-atgtcgcagccattgatctcatcc-3'
AP000391	Putative cytochrome P450	218	[F] 5'-gcaagaaccccatagtcaggata-3' [R] 5'-tggtagtagatcatcctcgtctgc-3'
AF416604	OsPR10	217	[F] 5'-acatgaaggagaggctggagt-3' [R] 5'-gactccttagccttggtgatct-3'
CAE05998	CAF1 family ribonucleases	214	[F] 5'-gtagatatcctgctgccgtgatg-3' [R] 5'-ctctctaaggtagccttcagatcc-3'
BAC99512	Putative Caffeic acid 3-O-methyltransferase	203	[F] 5'-cctcatgaaccaggacaaggtc-3' [R] 5'-gtagaggtcagcagcttctgggt-3'
AP003277	Putative Cysteine protease CP1	203	[F] 5'-aggagtcctaccgtacctgat-3' [R] 5'-gaactggaagttcctgcctgag-3'
AP005761	Putative Glucosyltransferase-3	208	[F] 5'-cggtctgatcaacagctcgac-3' [R] 5'-gaaggcgcagctacaccactgac-3'
AY098743	Globulin-like protein	198	[F] 5'-agtcgttctcagcgcgttag-3' [R] 5'-gcttgattcccactcagaacc-3'
AP002863	Putative Isoflavone reductase	204	[F] 5'-acgtacgtggtccaactacttc-3' [R] 5'-ccgatgttcaccgtctgttc-3'

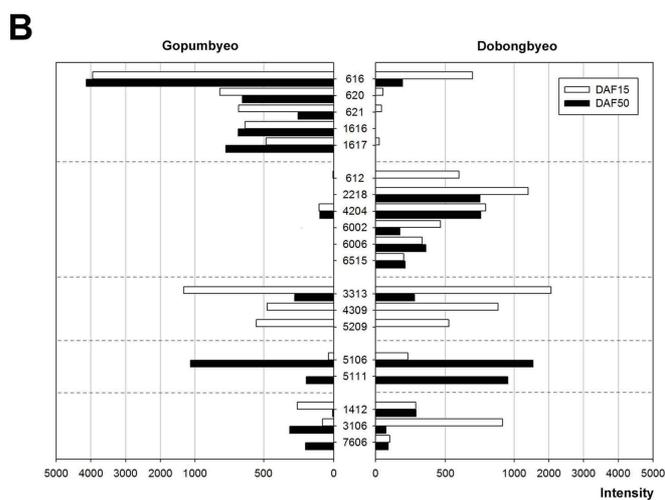
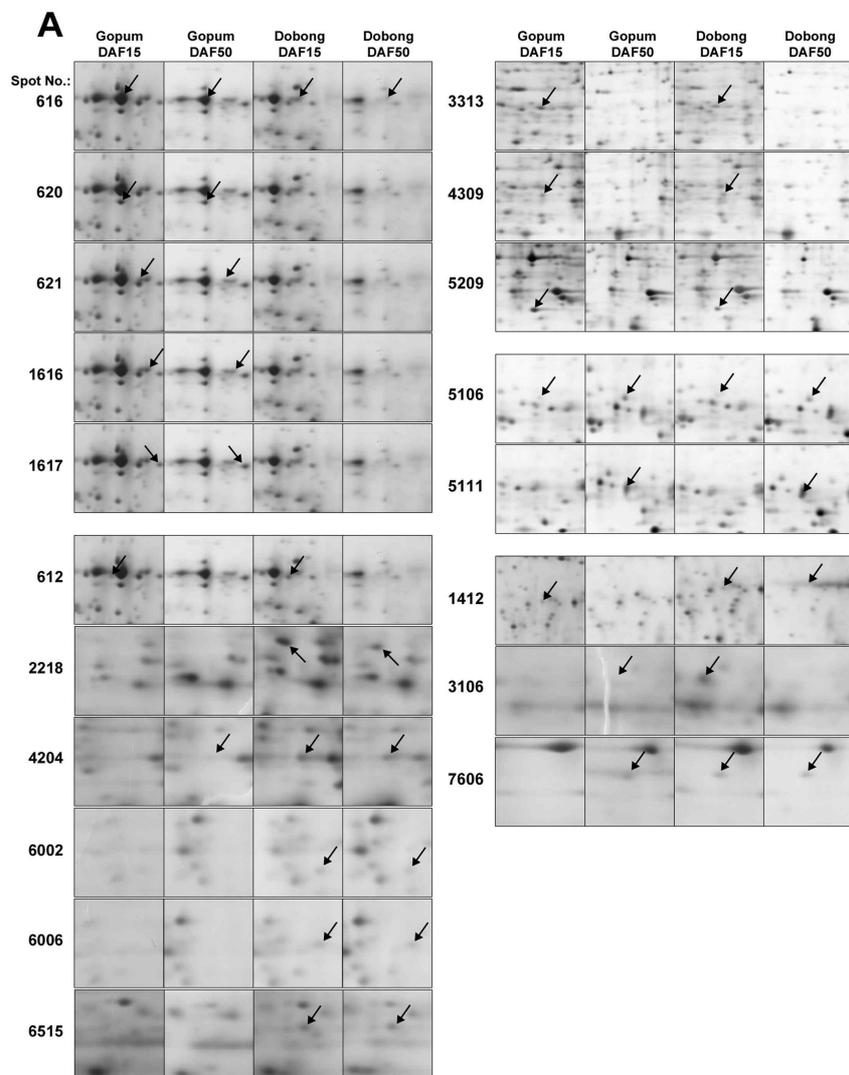


Figure 2-3. Quantitative comparison of the selected protein spots among those differentially expressed in each sample. (A) Enlarged images of specifically up- or down-regulated spots on four 2-DE gels. Arrowheads indicate chosen spots. (B) A comparison of relative intensities of the spots between two cultivars at the same developmental stage. White bars; spot intensity at 15 DAF, Black bars; spot intensity at 50 DAF.

또한 본 연구에서는 고식미와 저식미의 종자를 이용하고 단백질체학 방법을 사용하여 고식미 혹은 저식미 특이적으로 축적되는 단백질을 동정하여 식미관련 여부를 조사하는 연구를 수행하였다. 고식미인 고품벼와 저식미인 도봉벼의 종자를 파종하여 개화 후 각각 15일, 50일 경과 후 종자를 수확하여 2-Dimensional gel electrophoresis와 peptide mapping을 실시하여 고식미 혹은 저식미 특이적으로 축적되는 단백질을 동정하였다 (Figure 2-2). 선별작업을 몇 단계 거쳐서 최종적으로 고식미 또는 저식미 특이적으로 축적되는 15개의 단백질 spot이 동정되었다 (Table 2-1).

Table 2-2. List of the proteins showed difference of intensities more than five-folds between Gopumbyeo and Dobongbyeo.

Note: MM, experimental molecular masses; pI, experimental isoelectric points; coverage %, the percentage of sequence coverage.

Spot No.	Homologous protein	Protein type	MM	pI	Intensity				Matched peptide/Measured peptide	Cover-age (%)
					Gopum DAF15	Gopum DAF50	Dobong DAF15	Dobong DAF50		
The proteins specifically or highly accumulated in immature and mature Gopum-byeo or Dobong-byeo										
616	Protein disulfide isomerase	Metabolism	33.50	4.8	3945.48	4138.44	692.79	192.9	11/15	38
620	Protein disulfide isomerase	Metabolism	33.50	4.8	812.42	652.03	53.05	0		38
621	Protein disulfide isomerase	Metabolism	33.50	4.8	679.03	254.45	43.64	0		43
1616	Putative cytochrome P450	Secondary metabolism	60.34	7.2	632.85	681.85	0	0	9/12	11
1617	Protein disulfide isomerase	Metabolism	33.50	4.8	483.75	770.98	27.16	0		48
612	Protein disulfide isomerase	Metabolism	33.50	4.8	4.97	0	595.54	0		35
2218	Putative PrMC3	Secondary metabolism	34.14	5.4	0	0	1404.06	747.19	10/11	31
4204	60S acidic ribosomal protein P0	Secondary metabolism	34.47	5.4	104.18	100.97	786.72	752.4	4/4	17
6002	OsPR10	Pathogen resistance	17.27	5.8	0	0	463.81	175.15		38
6006	S-adenosylmethionine:2-demethylmen aquinone methyltransferase-like	Secondary metabolism	18.05	6.1	0	0	332.24	360.67		40
6515	CAF1 family ribonuclease	Metabolism	69.57	9.2	0	0	202.76	212.38	7/9	15
The proteins specifically or highly accumulated in immature Gopum-byeo or Dobong-byeo										
3313	Putative caffeic acid 3-O-methyltransferase	Secondary metabolism	40.07	5.4	1332.49	278.44	2063.7	278.42		39
4309	Putative cysteine protease CP1	Metabolism	40.42	5.2	474.52	0	876.16	0		19
5209	Putative isoflavone reductase	Secondary metabolism	33.48	5.7	553.74	0	523.75	0		56
The proteins specifically or highly accumulated in mature Gopum-byeo or Dobong-byeo										
5106	Putative glucosyltransferase-3	Metabolism	34.87	4.9	37.58	1131.93	232.57	1545.57		37
5111	Globulin-like protein	Protein Storage	52.39	6.8	0	195.65	0	944.48	8/10	20
Others										
1412	S-adenosylmethionine decarboxylase 2	Secondary metabolism	43.65	5.0	261.85	7.57	287	290.98		28
3106	Ascorbate peroxidase	Secondary metabolism	27.21	5.2	80.51	314.14	908.51	74.38		30
7606	Putative glycyL-tRNA synthetase	Metabolism	77.68	5.9	0	200.71	102.47	91.28		29

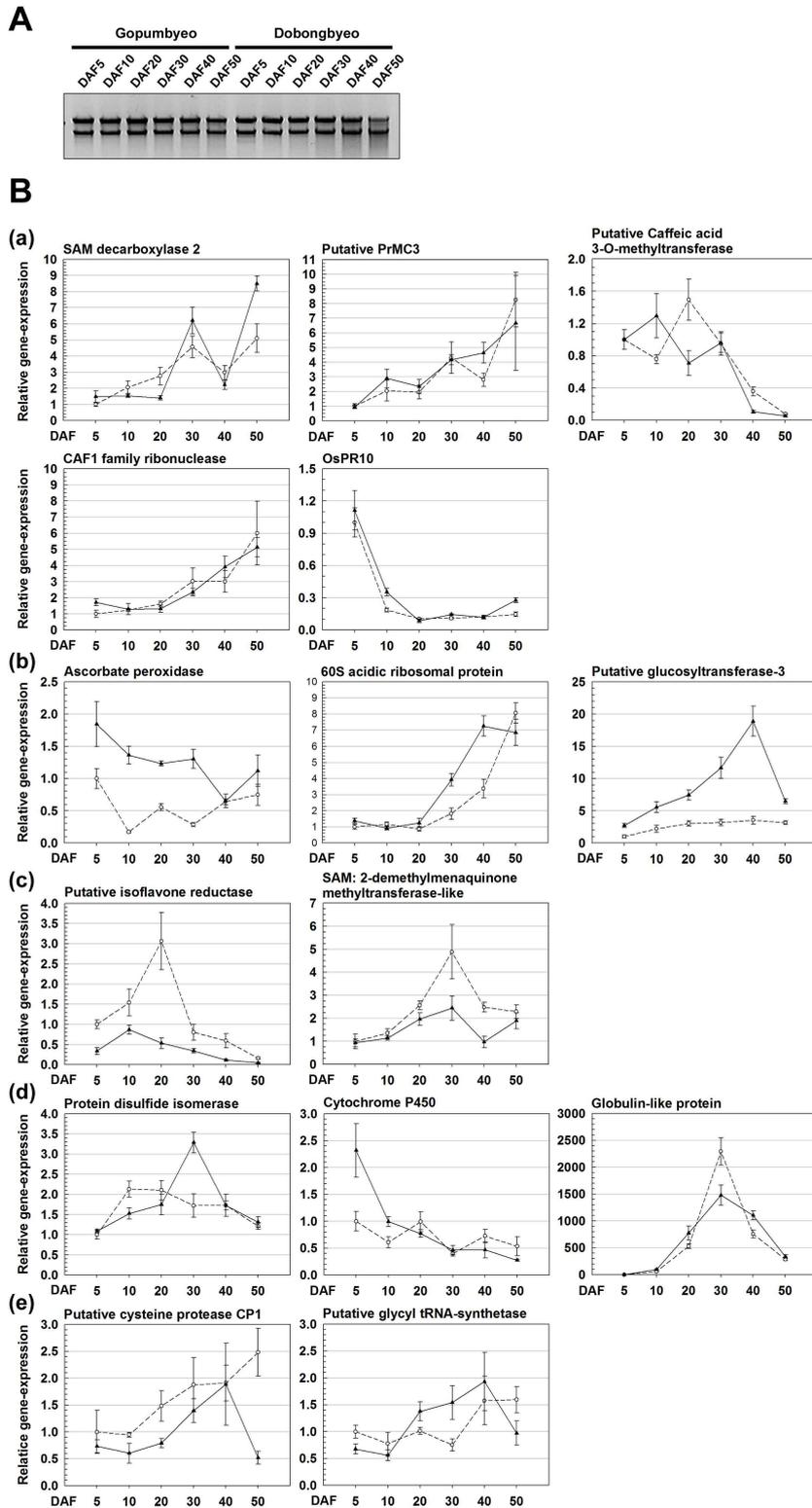


Figure 2-4. Transcript profile of corresponding genes for the selected proteins. (A) Total RNA was isolated from harvested seeds of two cultivars at indicated time points and then separated on formaldehyde-agarose gel. (B) First-strand cDNA was synthesized from equal quantities of total RNA and then analyzed by quantitative real-time PCR. The amplified cDNA from the total RNA sample extracted from Gopumbyeo at 5 DAF was used as a standard to compare relative quantities.

Based on expression patterns, the genes were divided into five groups: (a) The genes with similar patterns in both cultivars, (b) genes with higher expression in Dobongbyeo than in Gopumbyeo, (c) genes with higher expression in Gopumbyeo than in Dobongbyeo, (d) genes that are expressed in a stage-specific manner, and (e) genes with complicated expression. Short dash line; Gopumbyeo, Solid line; Dobongbyeo.

Table 2-3. List of primers used in this study

Accession No.	Gene name	Amplicon size (bp)	Sequences (5'-3')
P41095	60S acidic ribosomal protein P0	207	[F] 5'-tatgacagtggtcagcttcagc-3' [R] 5'-atgtgggtacgagattcggctc-3'
AP003525	Putative PrMC3	201	[F] 5'-tcatccgctctacgtgagcggcc-3' [R] 5'-cgcccggtgaagtacacgagga-3'
AP004464	Putative glycyl-tRNA synthetase	225	[F] 5'-agaacatgttgagggtgactgcc-3' [R] 5'-ccaggacagcaagaacatgctca-3'
AY987391	Protein disulfide isomerase	201	[F] 5'-aacgatgtccaagcaggttcgat-3' [R] 5'-ttagactcatccttgagaggctc-3'
AB050724	Ascorbate peroxidase	216	[F] 5'-ctggacgtccaaccttgatctt-3' [R] 5'-tcctcagcaaatcccagttcagag-3'
AJ251899	S-adenosylmethionine decarboxylase 2	201	[F] 5'-ctcaggtatctctgacatcatccc-3' [R] 5'-acctcttgacaaggtcaccatag-3'
AP005002	S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase-like	209	[F] 5'-acgctgaggtctacgaggacaat-3' [R] 5'-atgtcgagccattgatctcatcc-3'
AP000391	Putative cytochrome P450	218	[F] 5'-gcaagaacccatagtcaggata-3' [R] 5'-tggtagtacatcatcctctgtctgc-3'
AF416604	OsPR10	217	[F] 5'-acatgaaggagaggctgaggtt-3' [R] 5'-gactccttagccttggtgatct-3'
CAE05998	CAF1 family ribonucleases	214	[F] 5'-gtagatatactgctgcccgtgatg-3' [R] 5'-ctctcaaggtagccttcagatcc-3'
BAC99512	Putative Caffeic acid 3-O-methyltransferase	203	[F] 5'-cctcatgaaccaggacaaggctc-3' [R] 5'-gtagaggtcgagcagctcttggt-3'
AP003277	Putative Cysteine protease CP1	203	[F] 5'-aggagtctaccctgactgat-3' [R] 5'-gaactggaagttcctgctgag-3'
AP005761	Putative Glucosyltransferase-3	208	[F] 5'-cgttctgatcaacagttcgac-3' [R] 5'-gaaggcgagctacaccactgac-3'
AY098743	Globulin-like protein	198	[F] 5'-agtcgttctcagcgcgtttag-3' [R] 5'-gcttgattcccactcagaacc-3'
AP002863	Putative Isoflavone reductase	204	[F] 5'-acgtacgtggtgtccaactcttc-3' [R] 5'-ccgtatgttaccgtctgttc-3'

동정된 이들 단백질 함량이 전사 단계에서 조절되는지 또는 번역 단계에서 조절되는지 확인하기 위해서, 또는 단백질들이 종자에서 축적되는 양상과 mRNA가 발현 되는 양상과의 상관관계를 알아보기 위해서 단백질들을 코딩하는 유전자로부터 primer를 합성하여 (Table 3) real time RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 조사한 결과 각 단백질 마다 차이가 있었으며, 단백질이 종자에 축적되는 양상과 mRNA가 발현되는 양상이 서로 다르게 나타남을 알 수 있었으며 (Figure 4) 각각의 단백질들을 기능적인 측면에서 분석 및 목록화한 결과 동정된 대부분의 단백질들이 대사과정과 방어에 관여하는 단백질들이었으며 또한 저장단백질 역시 동정되었다.

목록화된 양상을 면밀히 분석한 결과 대사관련 단백질들은 고식미에서 특이적으로 축적되며, 저식미일수록 방어에 관여하는 단백질의 함량이 높으며 저장단백질의 함량은 저식미에서 특이적으로 높게 나타났다 (Table 2-2). 또한 대부분의 단백질이 종자에 축적되는 양상과

mRNA 발현 양상이 다르게 나타났는데 이는 동정된 단백질들의 함량이 번역후 조절됨을 의미한다. 즉 번역 후 modification (posttranslational modification) 되어서 안정성이 변하여 함량이 조절됨을 의미한다.

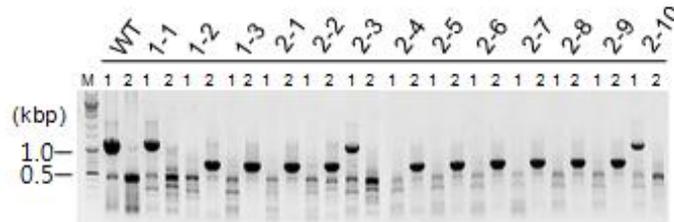
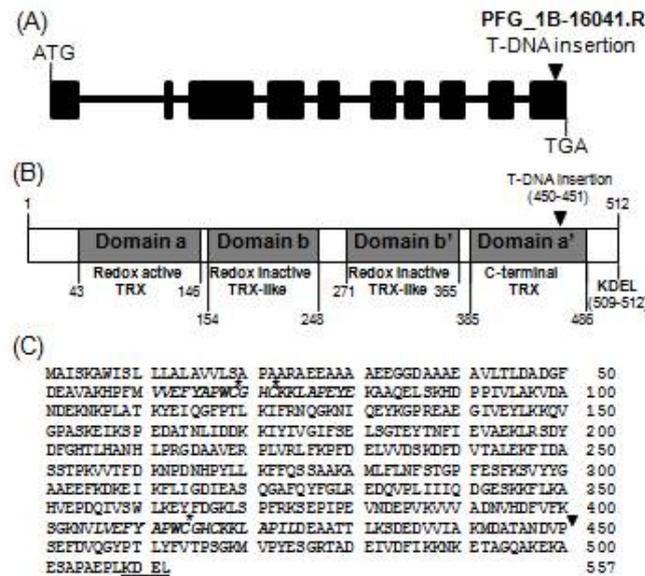


Figure 2-5. Identification of insertion of T-DNA in OsPDIL1-1 gene by PCR. Genomic DNA was isolated from wild type and mutant lines and used for PCR.

다음으로 동정된 단백질들을 코딩하는 유전자를 동정하고 이들 유전자가 파괴된 돌연변이 종자를 확보하여 돌연변이체를 분석하는 연구를 수행하였다. 먼저 PDI 유전자가 파괴된 돌연변이 종자를 확보하여 homozygote 선별작업을 실시하였다 (Figure 2-5).

Figure 2-6. The structure of the rice OsPDIL1-1 gene and indication of T-DNA insertion site.



(A) Schematic diagram of the OsPDIL1-1 (locus number Os11g09280). The OsPDIL1-1 gene is consisted of ten coding regions (black box) divided by nine introns. T-DNA was inserted in the tenth exon between +3187 and +3188bp downstream from ATG codon within OsPDIL1-1. The site is indicated by an arrowhead. (B) Schematic diagram of the OsPDIL1-1 protein. (C) Deduced amino acid sequences of OsPDIL1-1. Two thioredoxin catalytic domains are indicated as italics. Catalytic residues and ER retention motif are indicated as asterisks and underline, respectively. T-DNA insertion site is indicated by an arrowhead. TRX, thioredoxin.

Homozygote 를 선별하여 T-DNA가 삽입된 부위를 조사한 결과 translation termination 부분과 가까운 10번째 exon에 T-DNA가 삽입되어 있었음을 확인하였으며 단백질을 조사한 결과 450번째 아미노산을 코딩하는 코돈 다음에 T-DAN가 삽입되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 2-6).

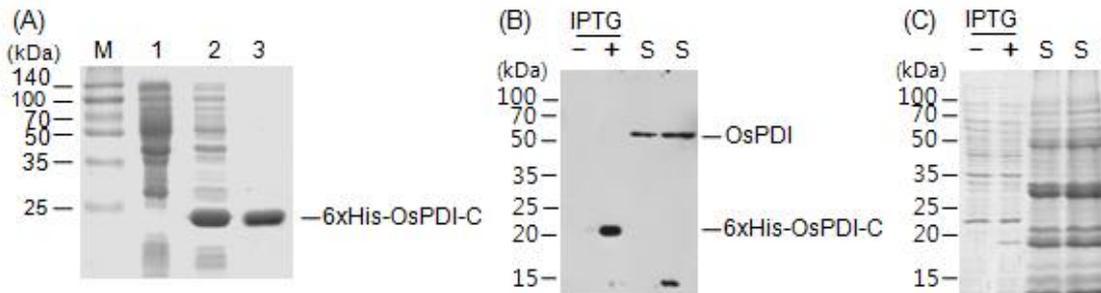


Figure 2-7. Purification of OsPDI-C protein in E.coli and production of OsPDI antibody. (A) OsPDI cDNA was cloned in E.coli expression vector pET28 and recombinant plasmid was introduced into E.coli BL21 cell. After induction with IPTG, total protein extract was applied onto nickel affinity column. Column washed with proper buffer and recombinant OsPDI protein was eluted with 250mM imidazole. Lane 1, crude extract which was not treated with IPTG; lane 2, crude extract which was treated with IPTG; lane 3, purified 6xHis-OsPDI-C. (B) OSPDI antibody was examined using total E.coli proteins and rice seed proteins. Lane Total proteins extracted from E.coli and rice seed were separated by 12% SDS-PAGE and then transferred onto PVDF membrane. The membrane was treated with anti-OsPDI antibody1. After western blot, membrane was stained with Coomassie brilliant blue (C).

벼의 발달과 개화, 종자 발달 등에 PDI 단백질의 발현 양상과 PDI에 의해서 안정성이 조절 되는 단백질을 동정하기 위해서 PDI에 대한 항체를 제작하였다. 항체를 제작하기 위해서 대장균 과다 발현 벡터를 제조하여 대장균에서 과다 발현을 하고 순수 분리하였으며 (Figure 2-7A), 순수 분리한 단백질을 토끼에 주입하여 항체를 생산하였으며 항체가 특이적으로 PDI 단백질을 인지하는지 검증하기 위해서 PDI를 과다발현하는 대장균 추출물을 이용하여 immunoblot을 실시하였다 그 결과 제작된 항체가 PDI 단백질을 특이적으로 인지함을 확인할 수 있었다 (Figure 2-7B).

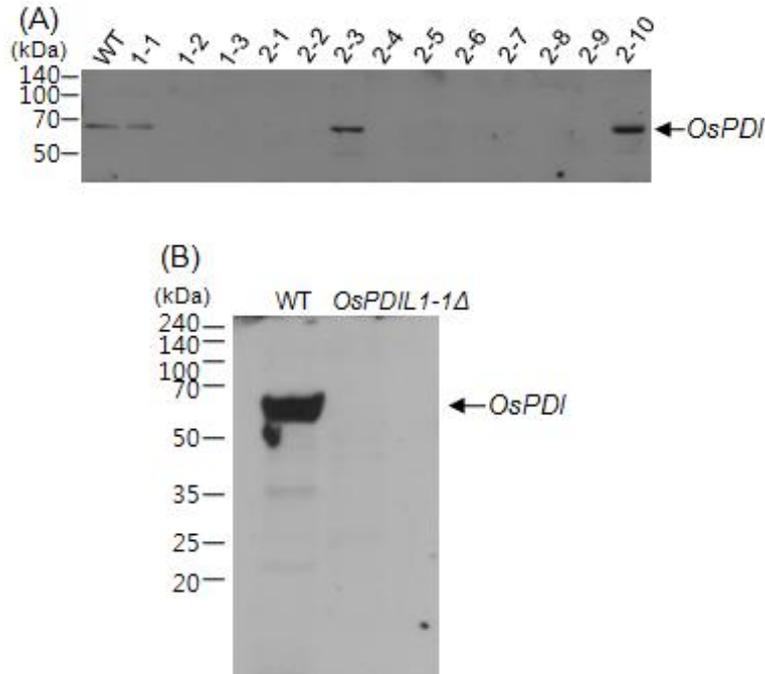


Figure 2-8. Identification of mutant lines by western blot. (A) Total proteins extracted from seeds of the lines described in Figure 4 were separated by SDS-PAGE and examined by western blot with anti-OsPDI antibody. (B) to confirm the mutant line, total seed proteins from WT and *OsPDIL1-1* Δ (line # 2-1) were re-examined by western blot with anti-OsPDI antibody.

생산된 항체를 이용하여 homozygote 선별을 다시 확인하였다. 각각의 돌연변이체의 종자에서 단백질을 추출한 후 immunoblot을 실시한 결과 real time RT-PCR 방법을 이용해서 분석한 것과 동일한 결과를 확인할 수 있었다 (Figure 2-8A). 그 중에서 돌연변이체 2-1을 이용해서 야생형과 각각 종자에서 총 단백질을 분리하여 다시 조사한 결과 확실하게 돌연변이체에서는 PDI 단백질이 합성되지 않음을 알 수 있었다 (Figure 2-8B). 따라서 다음에 수행되는 모든 실험에서는 돌연변이체 라인 번호 2-1을 사용하여 후속 실험을 수행하였다.

Table 2-4. Comparison of height and tiller number between wild type and *OsPDIL1-1* Δ mutant .

	Height (cm)	Tiller number
WT	51.2	14.3
<i>OsPDIL1-1</i> Δ	39.4	10.1

한편, 야생형과 돌연변이체 *OsPDIL1-1* Δ 를 파종하여 발달 형태를 조사한 결과 야생형에 비해서 돌연변이체의 키가 약 10 cm 정도 작은 것을 확인할 수 있었으며 분얼수도 4개 정도 작음을 확인할 수 있었다 (Table 2-4).

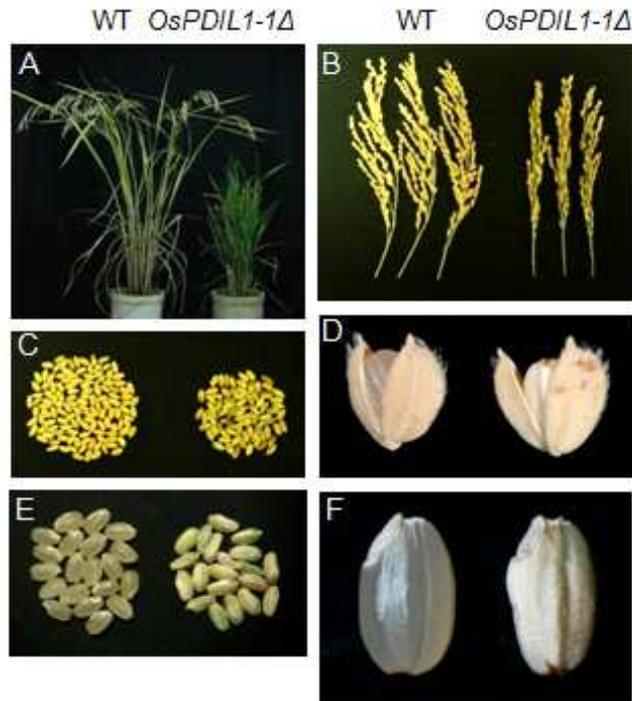


Figure 2-9. Phenotype of *OsPDIL1-1Δ* mutant. (A) Phenotypic analysis of the field-grown *OsPDIL1-1Δ* mutants. (B) Short panicle phenotype of the *OsPDIL1-1Δ* mutant. (C) Grains of wild type and *OsPDIL1-1Δ* mutant were collected and photographed. Palea and lemma of the grains of wild type and *OsPDIL1-1Δ* mutant were opened and removed (D-F). The mutant showed chalky and uneven phenotype (F).

한편 종자 발달을 조사한 결과 비정상적인 백화 (chalky) 현상을 보였으며 야생형에 비해서 돌연변이체 *OsPDIL1-1Δ*의 종자의 크기가 더 작음을 확인할 수 있었다 (Figure 2-9).

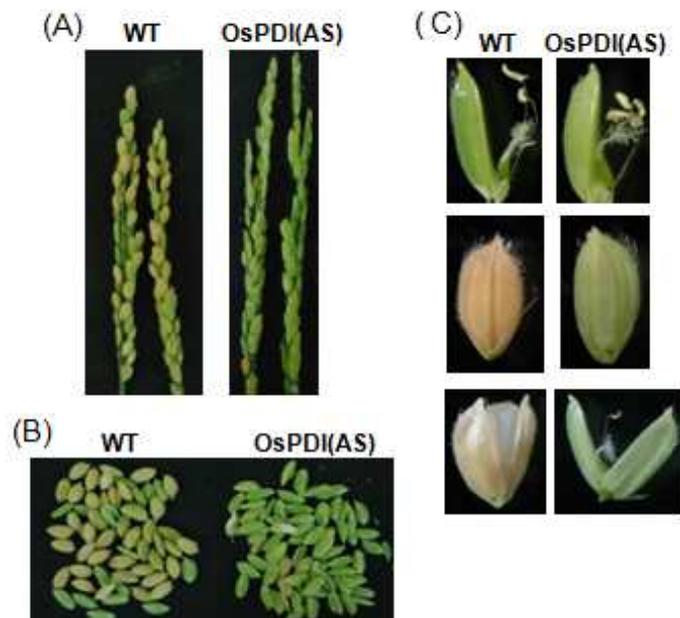


Figure 2-10. Phenotype of transgenic rice transformed with *OsPDI* antisense construct. (A) Panicle phenotype of the transgenic rice. (B) Grains of wild type and transgenic rice were collected and photographed. (C) Palea and lemma of the grains of wild type and transgenic rice were opened.

그리고 CaMV 프로모터를 이용해서 PDI 단백질을 생산을 억제하는 antisense construct가 도입된 형질전환체 벼를 이용하여 종자발달을 조사한 결과 형질전환체의 경우 대부분의 종자가 불임 또는 배아와 배유가 발달하지 못하는 종자를 생산하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2-10).

Table 2-5. Number and weight of OsPDIL1-1Δ mutant seed.

Seed number		Average seed weight (mg)	
Average/Total (Mature, %)	Average/Total (Mature, %)	WT	OsPDIL1-1Δ
WT	OsPDIL1-1Δ	WT	OsPDIL1-1Δ
131 /132 (99.2%)	67/86 (78%)	27.3	13.7

야생형과 돌연변이체에서 종자를 상세히 비교한 결과 종자 숫자가 야생형의 약 65% 수준이었으며 야생형의 경우 대부분의 종자가 정상적으로 발달을 하지만 돌연변이체의 경우는 약 78% 정도만이 정상적인 발달 야상을 보였다 (Table 2-5). 그리고 단위 종자 당 무게를 조사한 결과 야생형의 경우 27.3mg 정도인데 돌연변이체의 경우 약 13.7mg 정도로 약 50% 정도 수준임을 확인할 수 있었다 (Table 2-5).

Table 2-6. Comparison of grain dry weight and total protein amount from wild type and OsPDIL1-1Δ. Total protein concentration is measured by Kjeldahl Protein/Nitrogen Analyzer. A, dry weight per 100 grains; B, total protein amount per a grain; C, total protein amount per grain weight.

	Dry weight (g)/100 grains	Protein (mg)/grain	Protein (mg)/grain weight (g)
WT	2.34±0.12	1.66±0.06	70.09±2.55
OsPDIL1-1Δ	1.24±0.07	1.13±0.03	91.0±2.65

그리고 각각의 종자가 함유하는 단백질의 함량을 조사한 결과 단위 종자 당 단백질 함량은 돌연변이체 *OsPDIL1-1Δ*에서 비록 낮지만 (Table 2-6, Figure 2-11B) 단위 무게 당 단백질 함량은 돌연변이체가 약 1.3배 정도 높음을 알 수 있었다 (Table 2-6, Figure 2-11C).

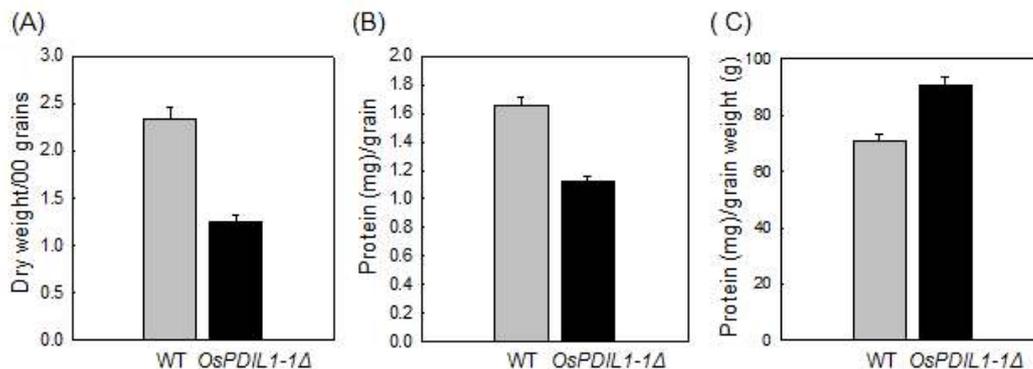


Figure 2-11. Dry weight and total protein amount of OsPDIL1-1Δ seed. Protein amount of WT and OsPDIL1-1Δ seed was measured by Kjeldahl Protein/Nitrogen Analyzer. (A), dry weight per 100 grains; (B), total protein amount per a grain; (C), total protein amount per grain weight.

기존의 결과에 의하면 PDI 단백질이 저장단백질들의 disulfide bond (S-S bond)를 isomerization 시켜서 저장단백질들의 안정성을 조절하고 결국 함량조절에 중요한 역할을 수행할 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 종자발달 단계별로 PDI 함량을 조사하여 PDI 단백질이 종자발달과 저장단백질의 함량과 상관관계가 있는지를 조사하고자 하였다. 개화 후 종자 발달 단계별로 종자를 확보한 후 각각의 종자에서 total protein을 추출한 후 immunoblot을 실시하였다. 그 결과 PDI 단백질이 개화 후 5일째부터 많은 양이 축적되며 종자가 성숙될 때까지 많은 양이 축적됨을 확인할 수 있었는데 이는 PDI 단백질이 종자발달이 끝날 때까지 중요한 역할을 수행함을 의미한다 (Figure 2-12).

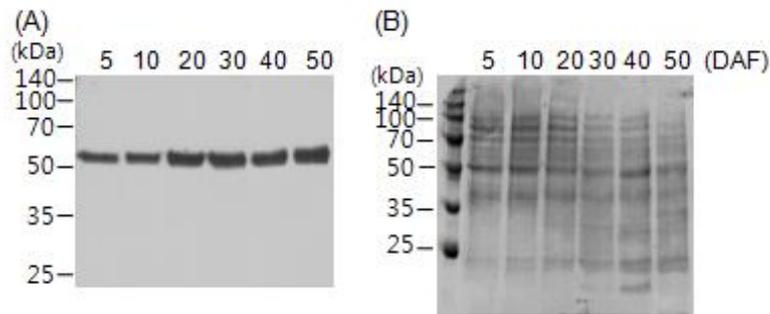


Figure 2-12. Examination of the level of OsPDI protein during seed development. (A) Total proteins were extracted from Gopumbyeo at indicated time point. After 12% SDS-PAGE, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane and then treated with anti-OsPDI antibody. After blotting, membrane was stained with Coomassie brilliant blue (B). DAF, Day After Flowering.

한편 종자발달 단계에서 PDI 유전자의 발현 양상과 단백질의 축적되는 양상을 비교 분석하기 위해서 PDI 유전자의 mRNA 발현양을 real time RT-PCR 방법으로 조사하였다. 그 결과 PDI mRNA 경우 개화 후 약 10일 20일째만 강하게 발현되고 발현양이 점차 감소하며 종자성숙이 거의 정지되는 단계에서는 거의 발현이 되지 않음을 확인할 수 있었다 (Figure 2-13). 이 결과는 단백질이 축적되는 양상과는 전혀 다른 패턴인데 (Figure 2-12, 2-13) 이는 PDI 단백질이 전사 후 변이 과정을 통해서 안정적으로 축적되어 저장단백질의 함량 조절에 관여함을 암시한다.

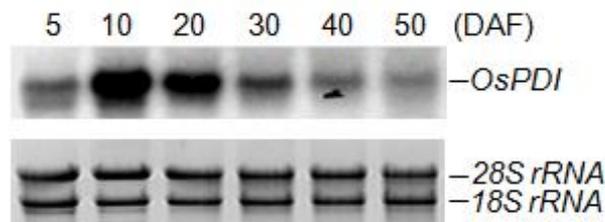


Figure 2-13. Expression pattern of the OsPDI gene during seed development. Total RNA was isolated from developing seeds at indicated time points and separated on formaldehyde-agarose gel. After electrophoresis, total RNA was transferred onto nylon membrane. The membrane was hybridized with ^{32}P -labeled OsPDI, washed with proper solution and then exposed on X-ray film. DAF, Day After Flowering.

한편 야생형과 돌연변이체에서 단백질 함량이 서로 다를 수 있었는데 종자내의 단백질들의 변화된 양상을 조사하기 위해서 먼저 SDS-PAGE를 실시하여 단백질 축적 양상을 조사하였다. 종자를 액체 질소를 이용하여 분쇄하고 동일한 양의 총 단백질을 조사한 결과 돌연변이체에서 특정 단백질들이 많이 축적되는 양상을 확인할 수 있었다 (Figure 2-14).

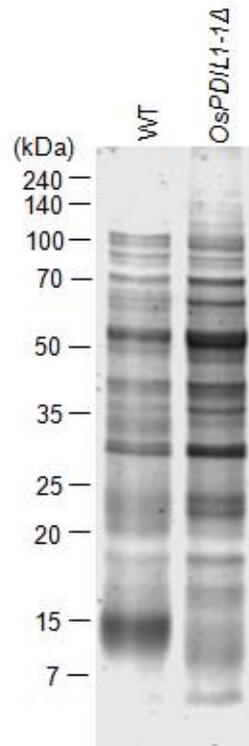


Figure 2-14. Comparison of seed proteins of WT and OsPDIL1-1Δ. Total seed proteins were extracted from WT and OsPDIL1-1Δ using buffer containing 50mM Tris-Cl (pH7.5), 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 2mM PMSF, and then separated by 10%-27% gradient SDS-PAGE.

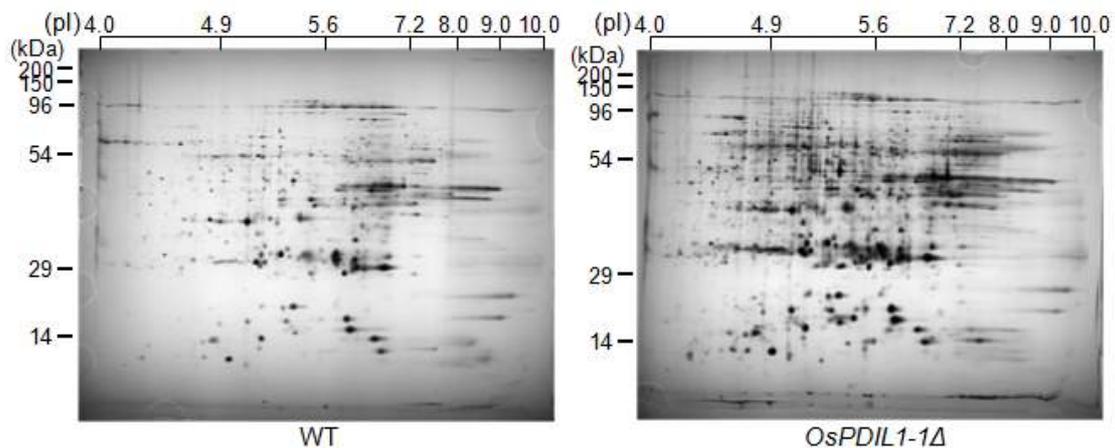


Figure 2-15. Analysis of OsPDIL1-1Δ seed proteins. Total proteins were extracted from the mature seeds of WT and OsPDIL1-1Δ mutant and then analyzed by two dimensional gel electrophoresis (2-DE).

그리고 변화된 단백질 함량뿐만 아니라 변화된 각각의 단백질들을 동정하기 위해서 2-D 전기영동을 실시하여 함량이 변화된 단백질들을 동정하는 실험을 실시하였다. 그 결과 1-D SDS-PAGE에서 확인했던 것보다 훨씬 많은 종류의 단백질들의 함량이 변화되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 2-15). 현재 이들 단백질을 단백질체학을 통해서 동정하여 목록화하고 있는데 이 결과로 함량이 변화된 단백질들이 PDI 단백질에 의해서 안정성이 조절될 가능성이 있음을 추측할 수 있다.

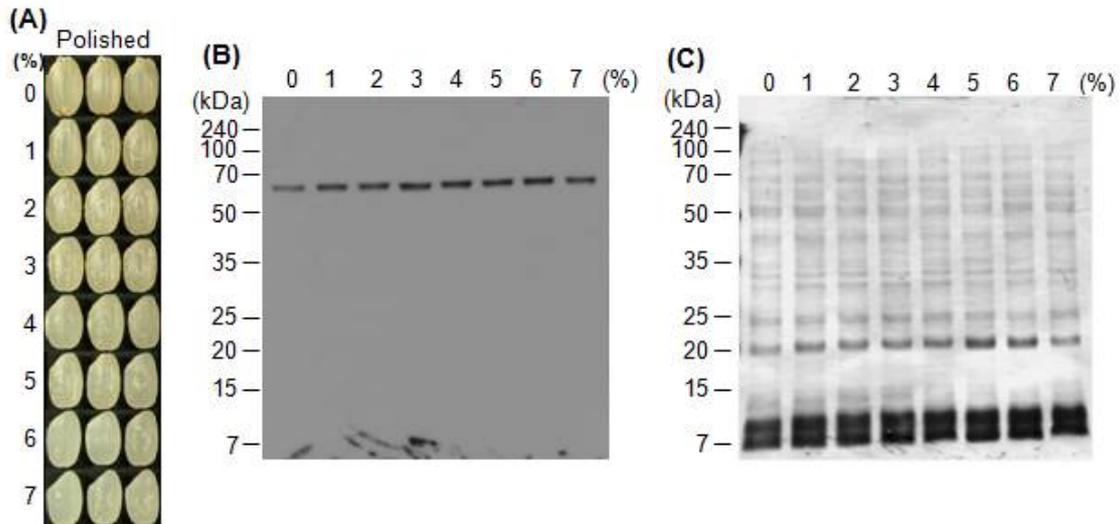


Figure 2-16. Analysis of OsPDI protein level using differently polished seeds. Dried seeds were polished at different extent and ground thoroughly, and then OsPDI level was examined by western blot with anti-OsPDI antibody.

한편 종자내에서 부위별로 PDI 단백질의 분포 양상을 조사하기 위해서 성숙이 완료된 야생형 종자를 각 단계별로 도정을 하여 PDI 단백질의 상대적인 함량을 조사하였다. 먼저 7분도까지 도정을 한 후 각각의 도정 단계별로 남아있는 종자를 분쇄하여 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE 를 실시하고 immunoblot을 통해서 PDI 단백질의 함량을 조사하였다. 그 결과 PDI 단백질이 종자내에서 거의 균일하게 분포되어있음을 확인할 수 있었다 (Figure 2-16).

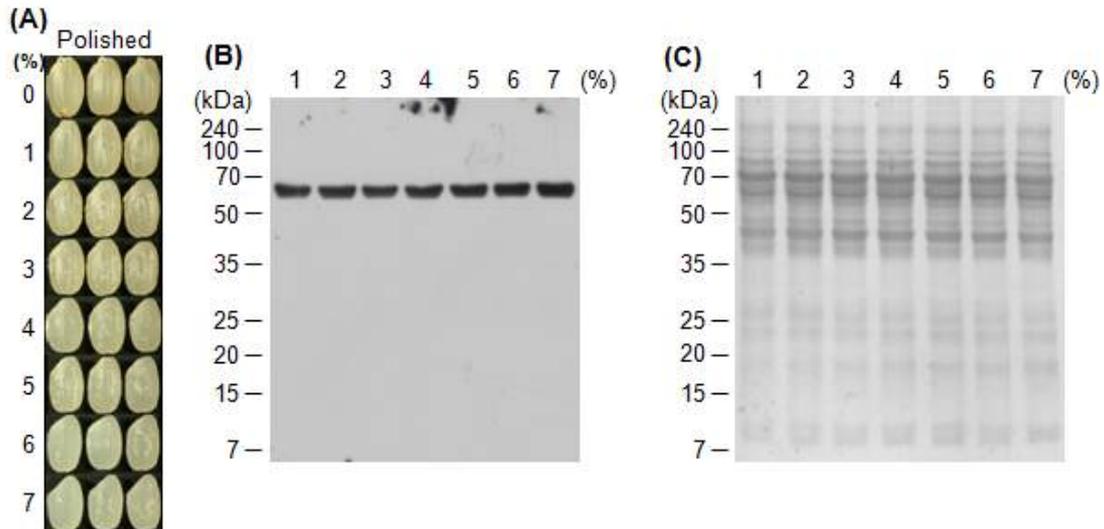


Figure 2-17. Analysis of OsPDI protein level using differently polished seeds. Dried seeds were polished at different extent, and the polished powder was used to examine OsPDI level by western blot with anti-OsPDI antibody.

또한 각각의 단계별로 도정 후 분쇄되어 나온 종자부위를 모아서 동일한 방법으로 PDI 함량을 조사하였다. 그 결과 역시 PDI 함량이 종자의 대부분 부분에서 동일하게 분포되었음을 알 수 있었다 (Figure 2-17).

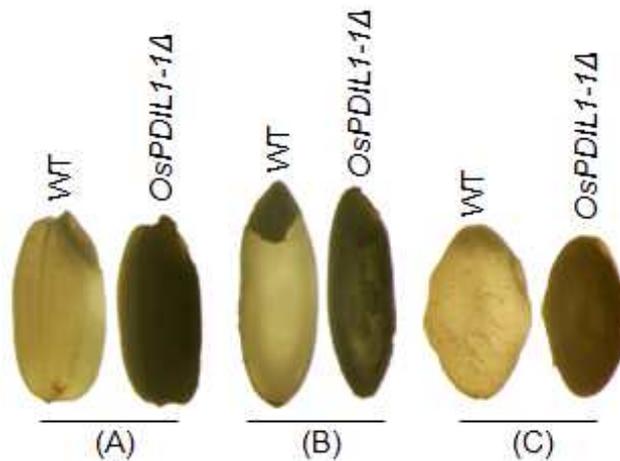


Figure 2-18. Phenotypes of mature seeds from WT and OsPDIL1-1 Δ mutant. Seed morphology is observed by using illuminator. Mature seeds from the WT and OsPDIL1-1 Δ mutant were harvested and hand-sectioned with a razor blade. (A), whole seeds; (B), vertically sectioned seeds; (C), transversely sectioned seeds.

OsPDIL1-1 Δ 돌연변이체의 종자의 경우 투명한 색깔이 아닌 백악질의 표현형을 보였다. 따라서 종자 내부의 형태를 조사하기 위해서 야생형과 돌연변이체의 종자를 수직 또는 수평으로 절단하여 투명정도를 형광등을 투시하여 관찰하였다. 그 결과 OsPDIL1-1 Δ 돌연변이체는 투명하지 않고 불투명하게 어두운 색깔을 보였다 (Figure 2-18).



Figure 2-19. Observation of WT and *OsPDIL1-1Δ* mutant seeds. Mature seeds from the WT and *OsPDIL1-1Δ* mutant were harvested and hand-sectioned with a razor blade. A, transverse sections; B, vertical sections. Bars = 1mm.

또한 일반적인 백화 현상을 조사하기 위해서 야생형과 돌연변이체의 종자를 수직 또는 수평으로 절단하여 현미경을 통해서 조사한 결과 돌연변이체의 종자의 내부는 하얗게 백악질화된 형태를 보였다 (Figure 2-19).

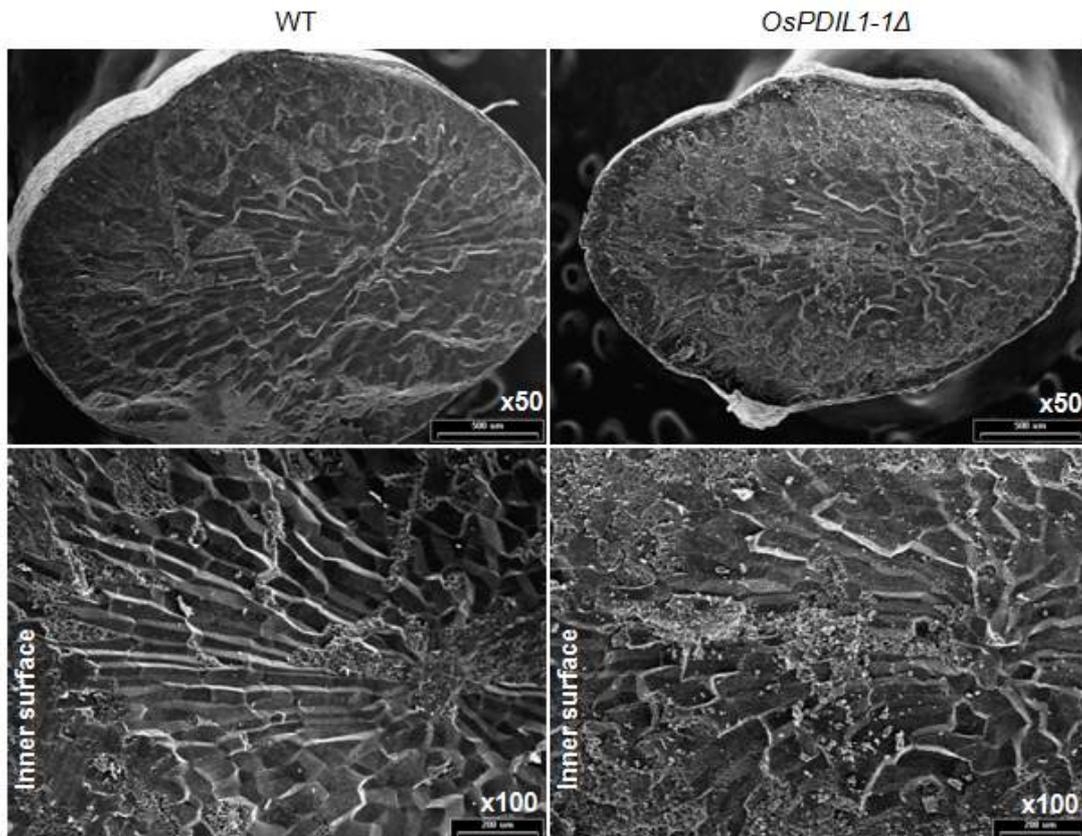


Figure 2-20. Morphology of transversely sectioned endosperm surface of mature seeds from WT and *OsPDIL1-1Δ* mutant. Mature seeds from the WT and *OsPDIL1-1Δ* mutant were harvested and hand-sectioned with a razor blade and then analyzed by SEM.

이들 결과는 OsPDIL1-1Δ 돌연변이체 종자의 탄수화물 조성이나 함량의 변화가 있었음을 암시하기 때문에 돌연변이체의 종자를 절단하여 전자현미경을 이용하여 종자 내부를 조사하였다. 그 결과 OsPDIL1-1Δ 돌연변이체의 종자는 야생형의 종자와 과 비교했을 때 탄수화물 배열이 불규칙적임을 알 수 있었다 (Figure 2-20). 그리고 탄수화물 알갱이 자체를 비교한 결과 대부분이 둥근 모양을 하고 있어서 OsPDIL1-1Δ 돌연변이체의 경우는 탄수화물 덩어리가 조밀하게 packing이 되지 않음을 알 수 있었다 (Figure 2-21, 2-22).

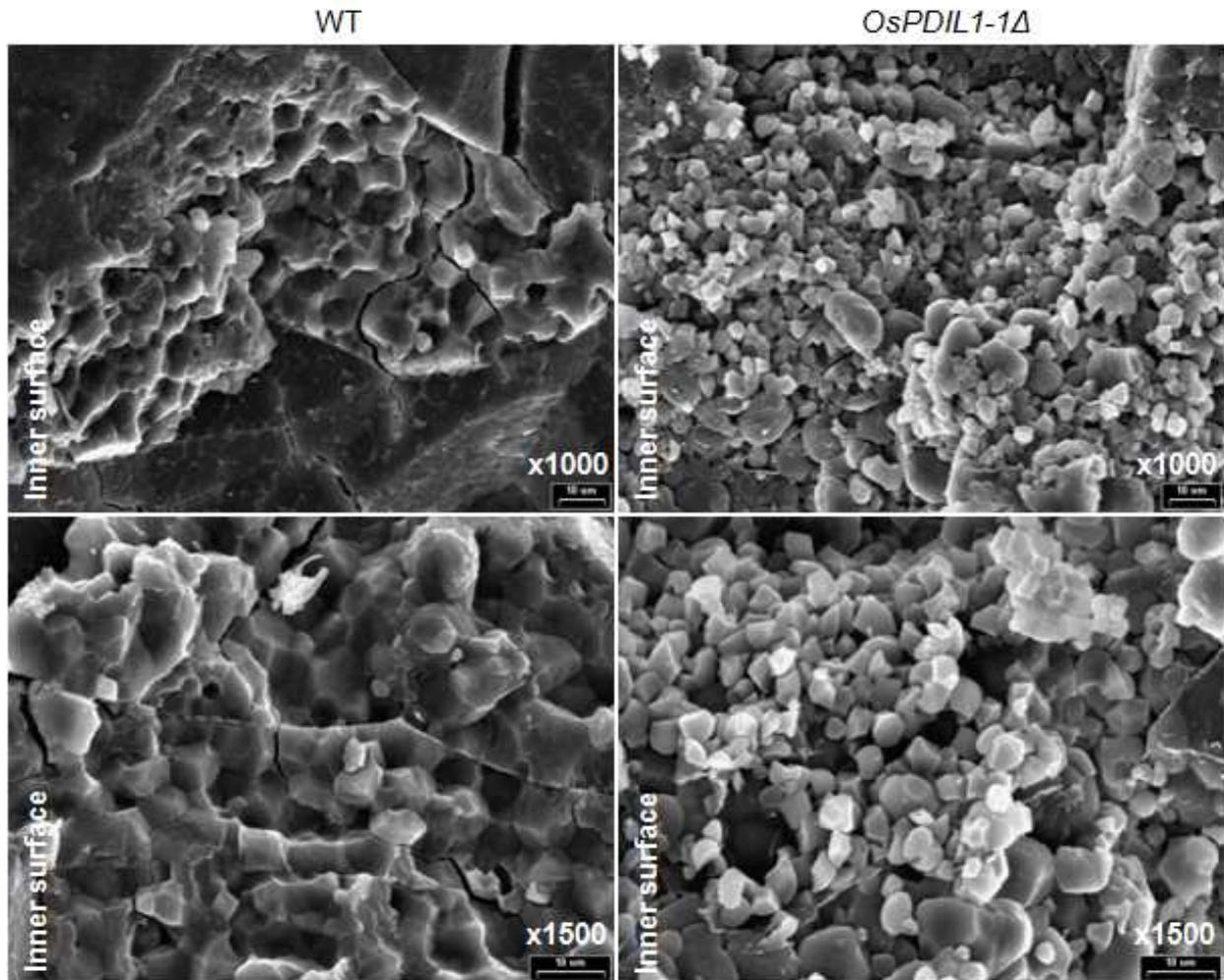


Figure 2-21. Morphology of transversely sectioned endosperm surface of mature seeds from WT and OsPDIL1-1Δ mutant. Mature seeds from the WT and OsPDIL1-1Δ mutant were harvested and hand-sectioned with a razor blade and then analyzed by SEM.

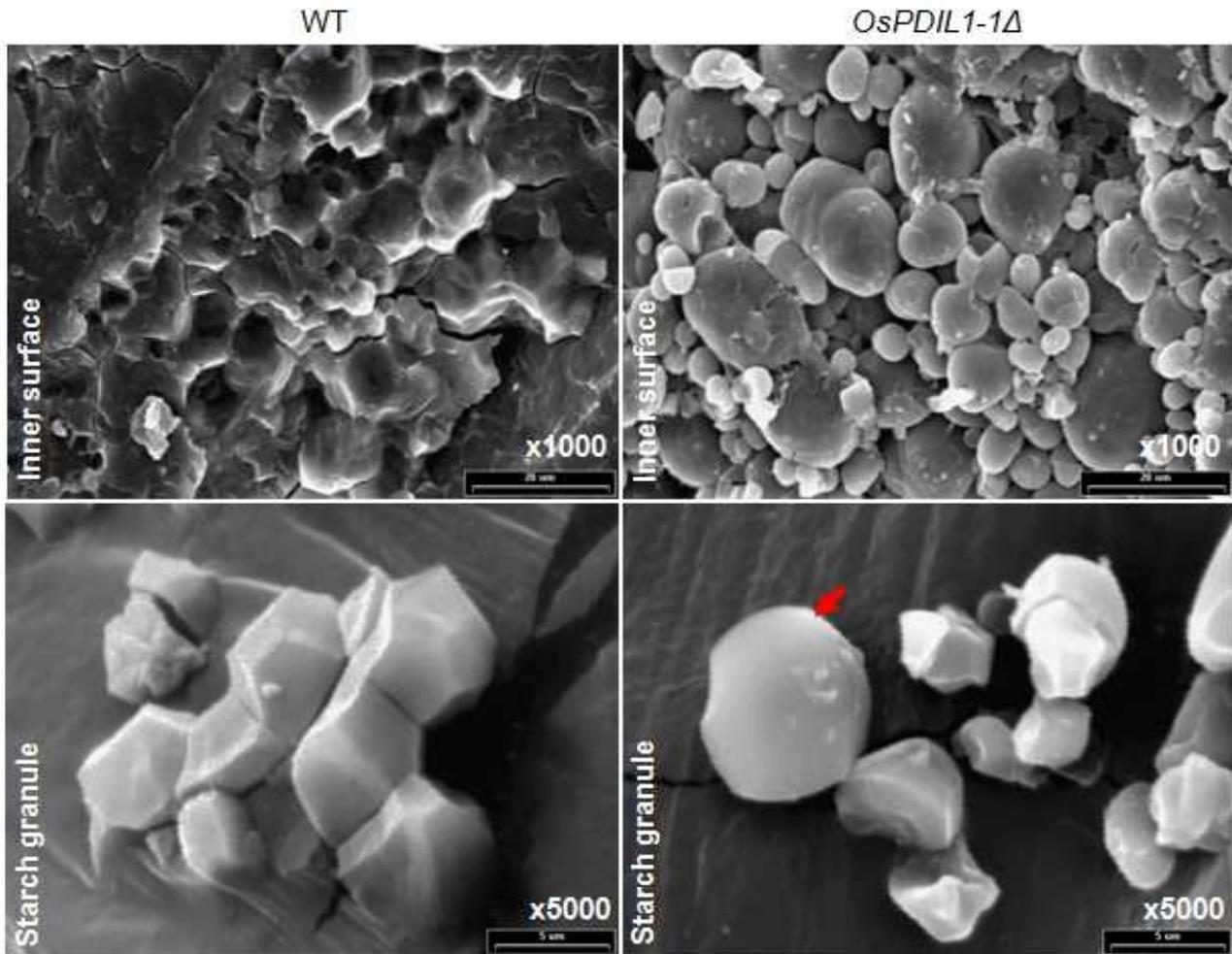


Figure 2-22. Morphology of starch granules of mature seeds from WT and *OsPDIL1-1Δ* mutant. Mature seeds from the WT and *OsPDIL1-1Δ* mutant were harvested and hand-sectioned with a razor blade and then analyzed by SEM. Compound starch granules in the endosperm of *OsPDIL1-1Δ* mutant are loosely packed as indicated by arrow.

또한 돌연변이체의 종자의 경우 단백질 함량과 조성에 변화가 있었기 때문에 종자내의 protein body의 모양과 분포를 조사하였다. 그 결과 야생형의 경우는 protein body가 뚜렷한 둥근 원형 형태로 존재하는 반면에 돌연변이체의 경우는 protein body가 비록 둥근 형태를 띠고 있으나 불안정한 형태이며 쉽게 부서질 수 있는 형태로 존재함을 알 수 있었다 (Figure 2-23).

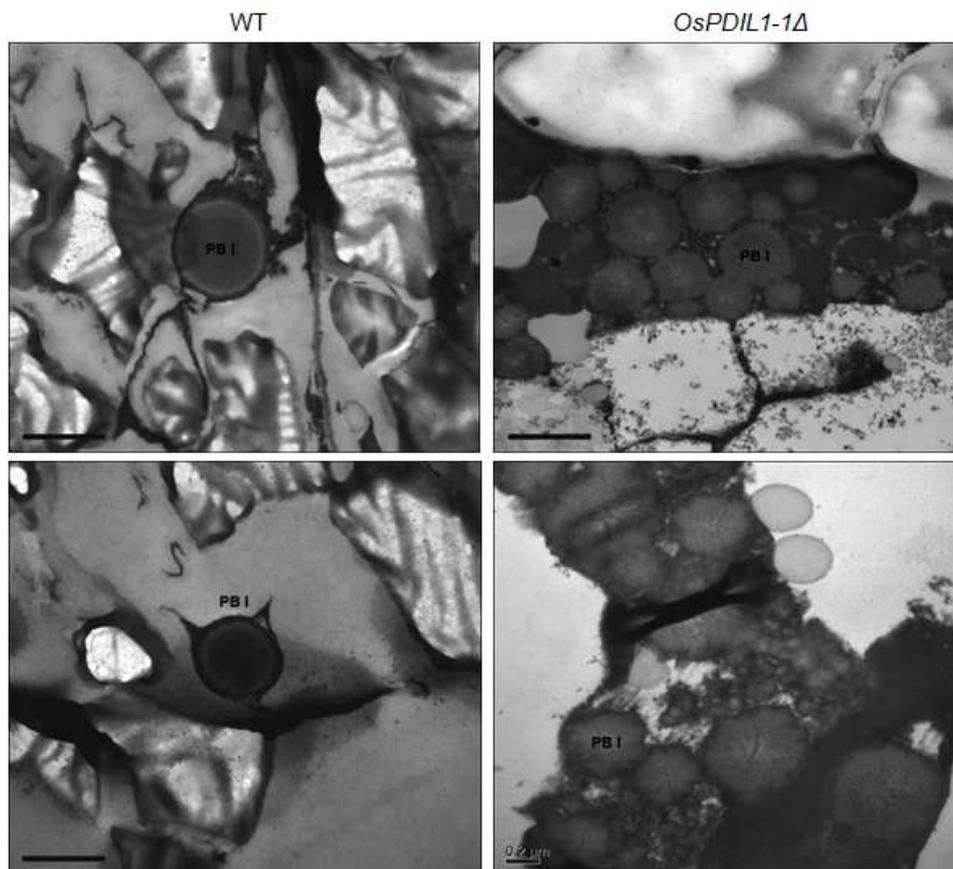


Figure 2-23. Morphology of protein bodies of mature seeds from WT and OsPDIL1-1Δ mutant. Mature seeds from the WT and OsPDIL1-1Δ mutant were harvested and hand-sectioned with a razor blade and then analyzed by SEM. The protein bodies in the endosperm of OsPDIL1-1Δ mutant are not tight circle shape and their color in the endosperm of OsPDIL1-1Δ mutant is slightly bright compared to wild type.

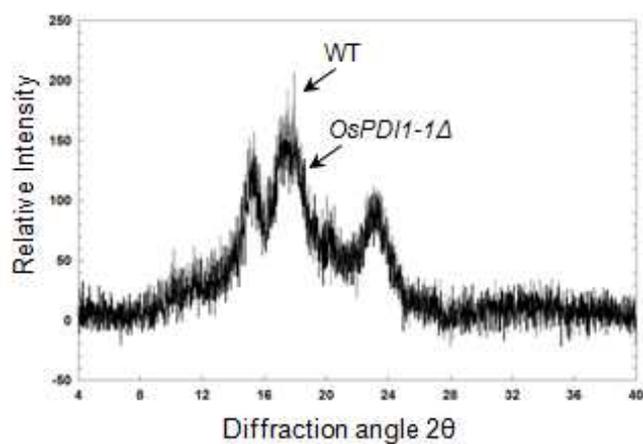


Figure 2-24. X-ray diffraction pattern of the starch granules purified from wild type and OsPDIL1-1Δ mutant.

탄수화물의 비정상적인 모양과 분포는 탄수화물 구성 성분이나 형태가 변화되었음을 의미한다. 따라서 야생형과 OsPDIL1-1Δ 돌연변이체의 종자를 분쇄하고 X-ray를 조사하여 탄수화물 구성 상태를 조사하였다. 그 결과 미세하게 야생형과 돌연변이체의 회절 양상이 다르기는 하지만 큰 차이를 보이지는 않았다 (Figure 2-24).

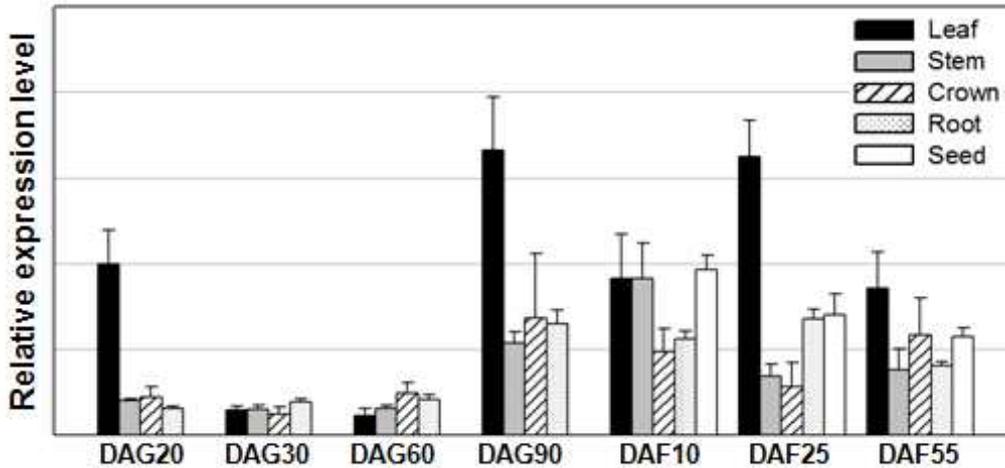


Figure 2-25. Expression profile of the OsPDI during development. Total RNA was isolated from developing rice organs at indicated time points and then used for analyzing of mRNA level by real time RT-PCR. DAG, Day After Germination; DAF, Day After Flowering.

기존의 연구 결과에 의하면 PDI 유전자는 종자 특이적으로 발현된다고 보고가 되었다. 따라서 본 연구에서도 PDI 유전자의 발현 양상을 조사하였다. 그러나 본 연구 결과에 의하면 PDI 유전자는 종자뿐만 아니라 다양한 기관에서 발현되며 특히 잎에서 상대적으로 발현이 많이 됨을 알 수 있었다 (Figure 2-25).

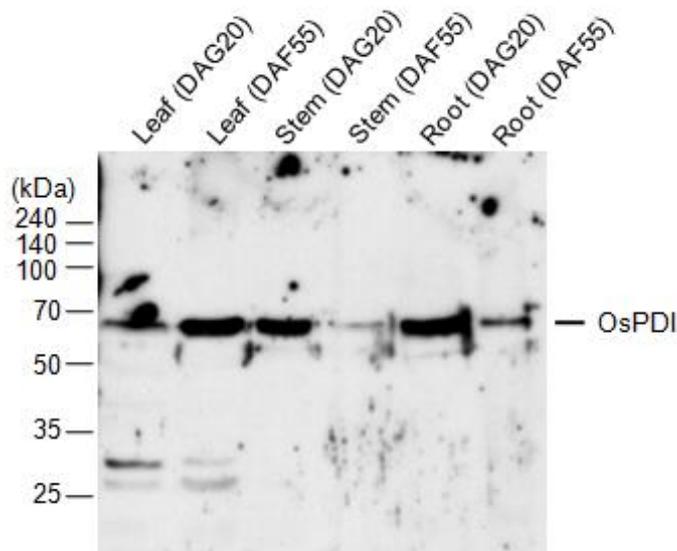


Figure 2-26. Examination of OsPDI protein level in developing rice organs. Total proteins were isolated from developing rice leaf, stem and root at indicated time points and then used for analysis of OsPDI protein level by western blot with OsPDI antibody. DAF, Day After Flowering.

또한 발현양상을 PDI 항체를 이용하여 immunoblot을 통해서 조사한 결과 역시 잎, 뿌리, 줄기 등 다양한 조직에서 발현됨을 알 수 있었다 (Figure 2-26).

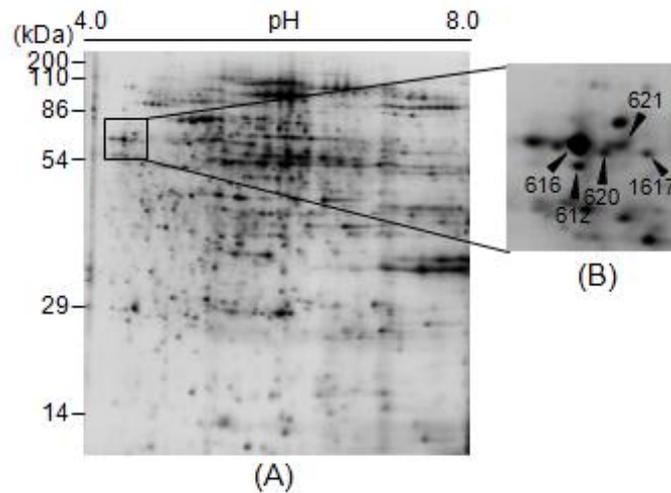


Figure 2-27. Proteomic analysis of protein disulphide isomerase (PDI) in rice seed. (A) Two dimensional gel electrophoresis of immature rice seed at 15 DAF. Each protein spot was identified by MALDI-TOF MS. (B) Boxed region in (A) was enlarged. All of the arrowheads indicate OsPDI protein spot, suggesting that function and stability of OsPDI protein must be post-translationally regulated. Identified spot numbers are also indicated on the gel.

그리고 흥미로운 또 다른 사실은 2-D 전기영동을 통한 단백질체학 방법으로 분석한 결과 PDI 단백질의 경우 5개의 단백질 spot이 검정 되었는데 이는 PDI 단백질이 전사 후 변이 (post-translational modification)를 통해서 변이 된 후에 기능과 안정성이 조절됨을 암시한다 (Figure 2-27).

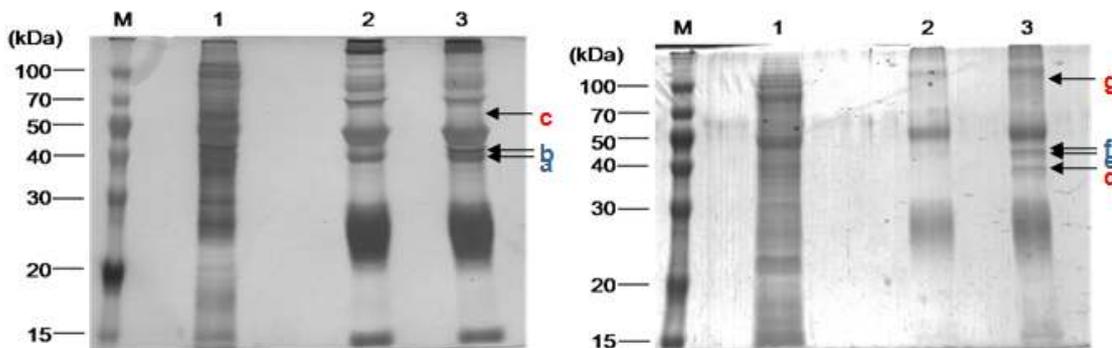


Figure 2-28. Isolation of OsPDI-interacting protein by immunoprecipitation. Total proteins were extracted from whole panicle of Gopumbyeo at DAF15 and then incubated with OsPDI antibody-coupled protein A sepharose for overnight at 4°C. After washing, bead was mixed with protein cooking buffer and boiled for 3 mins, and then analyzed by 8% SDS-PAGE. Protein bands specifically detected by coimmunoprecipitation with anti-OsPDI antibody were isolated from gel, and then analyzed by MALDI-TOF/MS. M, Size marker; Lane 1, Total protein extracted from whole panicle; Lane 2, anti-serum coupled beads; Lane 3, Co-immunoprecipitated protein.

PDI 단백질의 기본적인 기능은 PDI 단백질과 상호작용하는 단백질들의 disulfide bond를 isomerization 시켜서 상호작용하는 단백질들의 안정성과 기능을 조절하는 것이다. 다양한 조직에서 PDI 단백질이 발현되지만 먼저 종자내에서 PDI 단백질과 상호작용하는 단백질을 면역침강 (immunoprecipitation) 방법으로 분리하고자 하였다. 면역침강 후 1-D 전기영동 (Figure 2-28)을 실시한 후 peptide mapping 방법으로 상호작용하는 단백질을 분리 동정하였다.

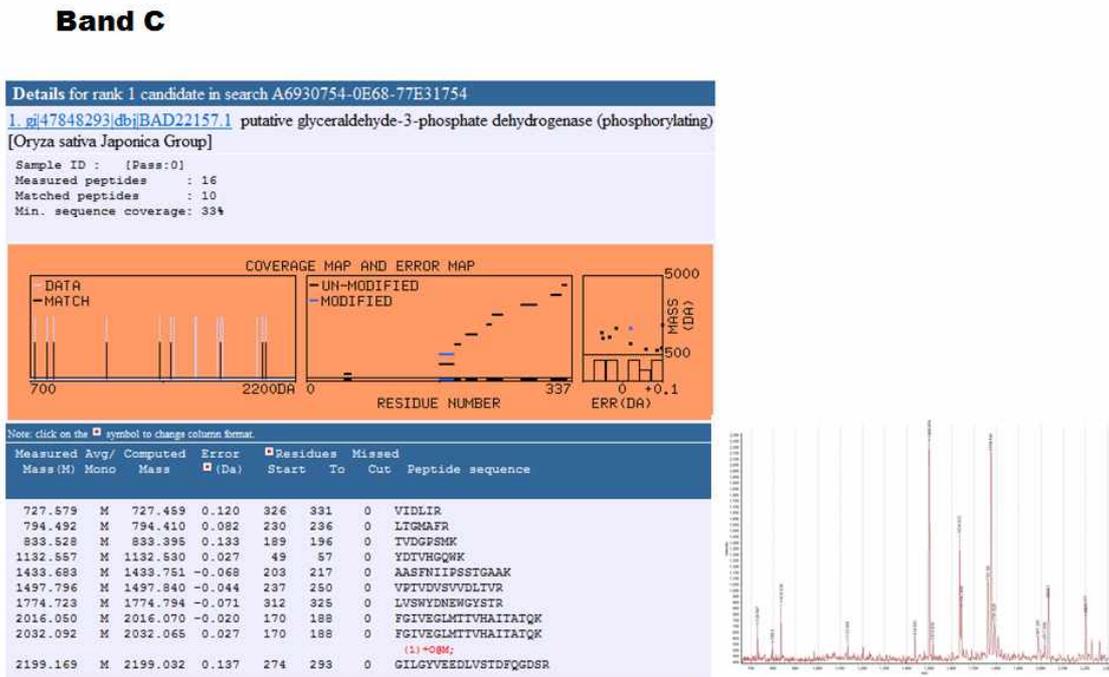


Figure 2-29. Identification of OsPDI-interacting protein. Protein band C was identified to putative glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by MALDI-TOF/MS.

그 결과 두개 단백질을 분리할 수 있었으며 각각의 단백질들은 putative glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase와 putative pyruvate orthophosphate dikinase였다 (Figure 2-29, 2-30). 현재 이들 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하여 동정중이다.

Band G

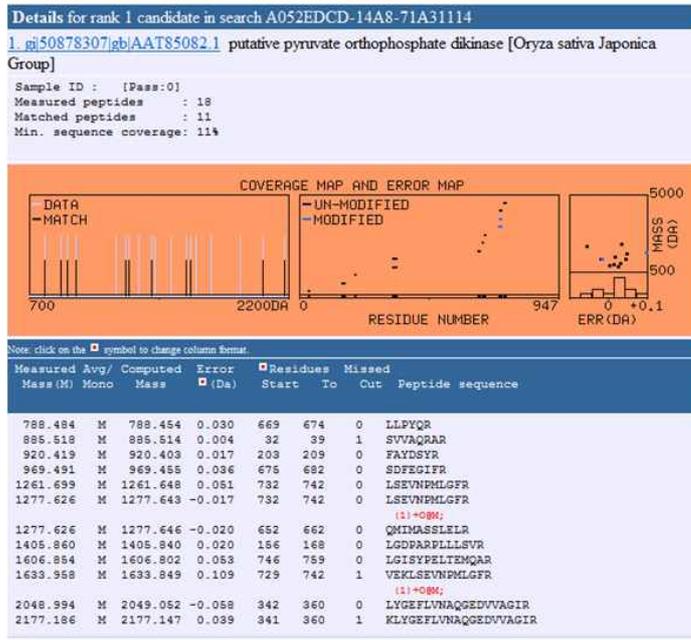


Figure 2-30. Identification of OsPDI-interacting protein. Protein band G was identified to putative pyruvate orthophosphate dikinase by MALDI-TOF/MS.

또한 2-D 전기영동과 단백질체학을 통해서 동정한 단백질중의 하나가 PrMC3인데 이 단백질은 lipase 활성 또는 지베렐린 수용체로서 기능을 갖는 단백질이다. 2-D 전기영동 결과 미성숙 종자에서는 고식미와 저식미에서 많은 양이 축적 되지만 성숙된 종자에서는 오직 저식미인 도봉벼에서 만 축적이 되는 양상을 보였다 (Figure 2-31). 이는 PrMC3 단백질이 식미를 결정하는데 중요한 인자로 작용할 수 있음을 의미한다.

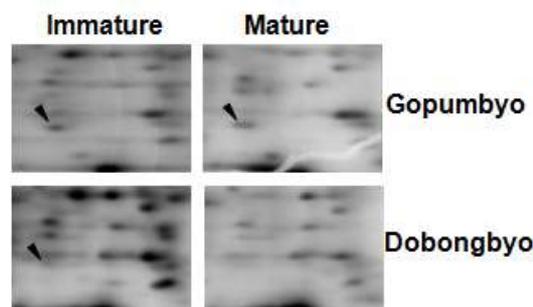


Figure 2-31. Proteomic analysis of rice PrMC3 in rice seed. Total proteins were extracted from Gopumbyeo and Dobongbyeo and separated by two dimensional gel electrophoresis. Protein spots were identified by MALDI-TOF MS. Arrowhead indicate PrMC3 (esterase/GA receptor).

한편 PrMC3 발현 양상을 real time RT-PCR 방법으로 조사한 결과 다양한 조직에서 발현됨을 알 수 있었다. 특히 어린잎에서 발현양이 높으며 노화된 뿌리와 성숙된 종자에서도 발현이 많이 됨을 알 수 있었다 (Figure 2-32).

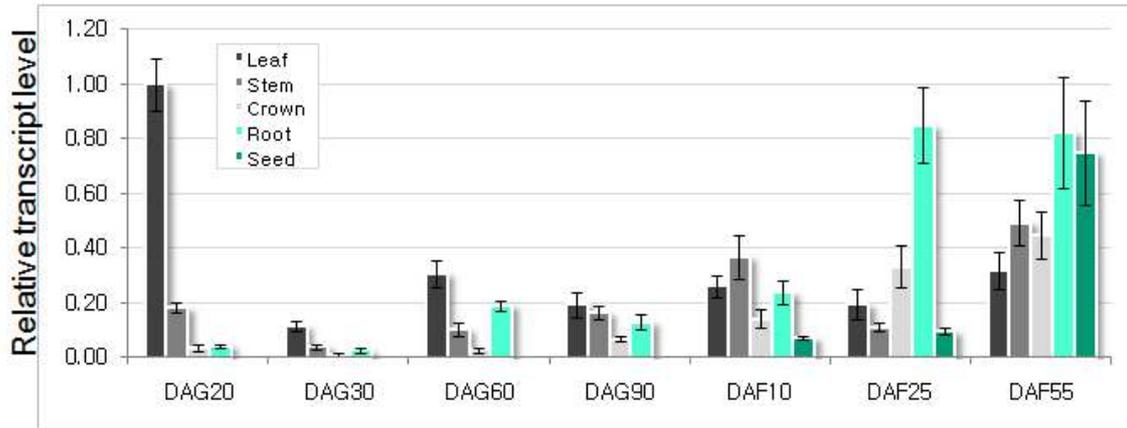


Figure 2-32. Expression profile of a PrMC3 gene during development. Total RNA was isolated from developing rice organs at indicated time points and then used for analyzing of mRNA level by real time RT-PCR. DAG, Day After Germination; DAF, Day After Flowering.

PrMC3 단백질을 코딩하는 유전자가 파괴된 돌연변이체 *Osprmc3*를 분리하여 성장 발달 양상을 조사한 결과 돌연변이의 경우 야생형에 비해서 키가 약 절반정도이고 분얼수 (tiller)는 약 3배 정도 많음을 알 수 있었다 (Figure 2-33).



	Height (cm)	Tiller No.
WT	101.8	12.2
<i>Prmc3</i>	50.2	38.6

Figure 2-33. Phenotype of *Osprmc3* mutant. (A) Wild type and *Osprmc3* mutant were grown in the field and photographed (Left side). Height and tiller number of wild type and *Osprmc3* were also measured (right side).

잎의 발달 양상을 조사한 결과 돌연변이 *Osprmc3*의 경우 야생형에 비해서 짧고 잎 폭 역시 좁은 양상을 보였다. 색소를 제거한 후 잎맥을 조사한 결과 돌연변이의 경우 야생형에 비해서 제1 잎맥을 포함한 모든 잎맥의 넓이가 매우 좁은 양상을 보였으며 그로인해 잎 발달이 저해 받았음을 알 수 있었다 (Figure 2-34).

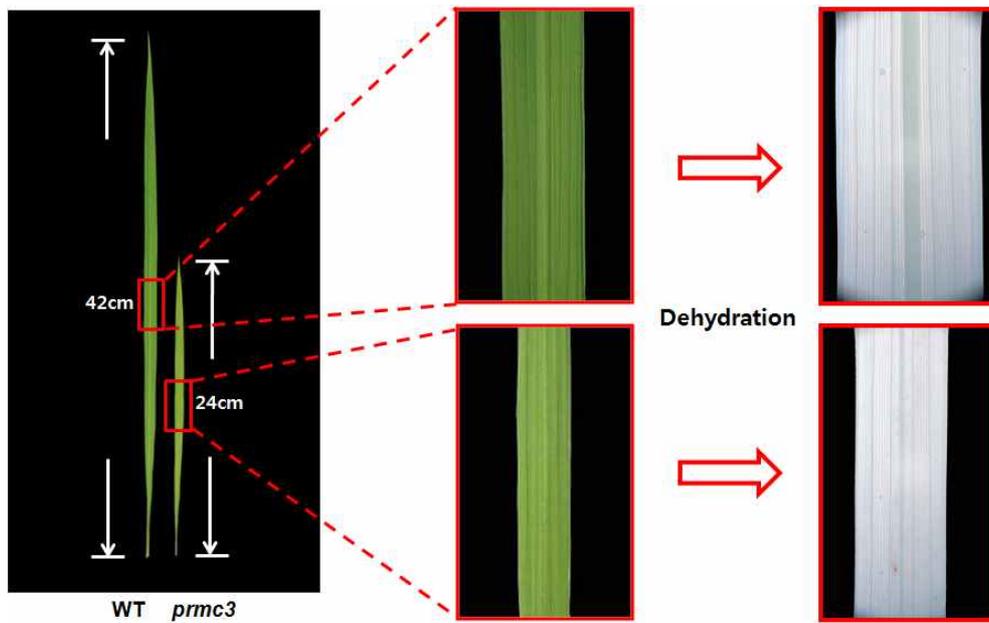


Figure 2-34. Leaf phenotype of *Osprmc3* mutant. (A) Leaves were taken from field-grown wild type and *Osprmc3* mutant, decolorized and then photographed.

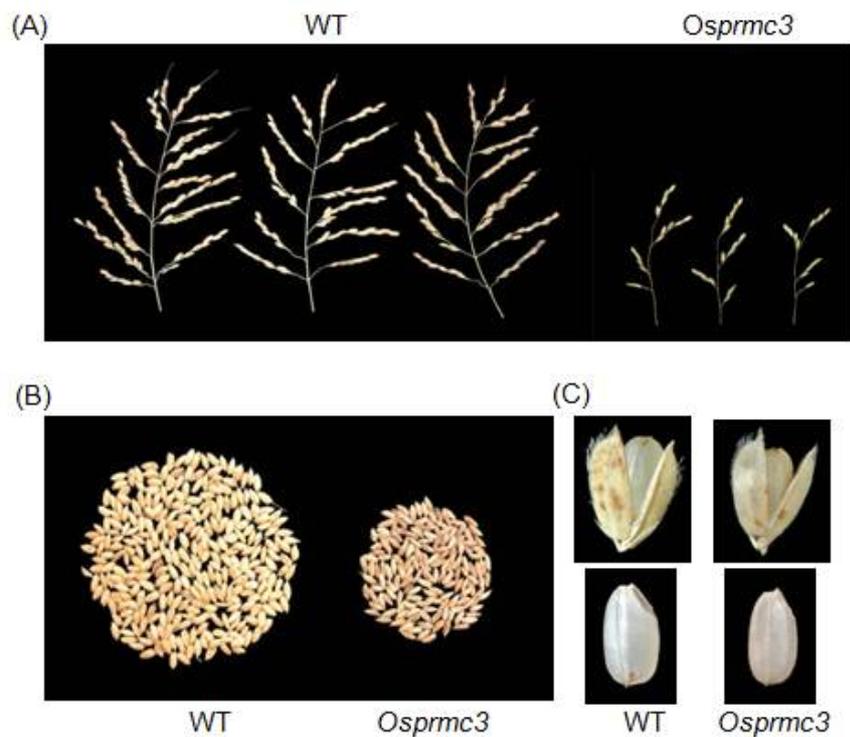


Figure 2-35. Seed phenotype of *Osprmc3* mutant. (A) Panicle phenotype of the *Osprmc3* mutant. (B) Grains of wild type and *Osprmc3* mutant were collected and photographed. (C) Palea and lemma of the grains of wild type and *Osprmc3* mutant were opened and removed. The mutant showed small chalky phenotype.

한편 종자 발달 양상을 조사한 결과 *Osprmc3* 돌연변이체의 경우 종자 형태가 백악질을 보였으며 (Figure 2-35) 단위 이삭 당 종자 수가 약 13개 정도로 야생형에 비해서 10% 정도의 수준을 보였으며 그 중에서도 약 57% 정도만이 정상적인 성숙 종자를 보였다 (Table 2-7). 또한 단위 종자의 무게를 측정된 결과 야생형이 27.1 mg인데 반해 *Osprmc3* 돌연변이체의 경우 약 15.4 mg 정도 였다 (Table 2-7)

Table 2-7. Analysis of *Osprmc3* mutant seed

	Total seed No.	% of mature seed	Dry weight per seed (mg)
WT	113.6	88.9	27.1
<i>Osprmc3</i>	13.6	57.4	15.4

단백질체학을 통해서 동정한 단백질 중에서 세번째는 ascorbate peroxidase b (*OsAPxb*)로서 식물 방어에 관여하는 기능을 갖는 단백질이다. *OsAPxb* 단백질의 경우 미성숙 종자에서는 고식미와 저식미에서 많은 양이 축적 되지만 성숙된 종자에서는 오직 저식미인 도봉벼에서만 축적이 되는 양상을 보였다 (Figure 2-36). 이는 *OsAPxb* 단백질이 식미를 결정하는데 중요한 인자로 작용하면서 동시에 저식미 일수록 생물체와 비생물체에 의한 스트레스에 강함을 의미한다.

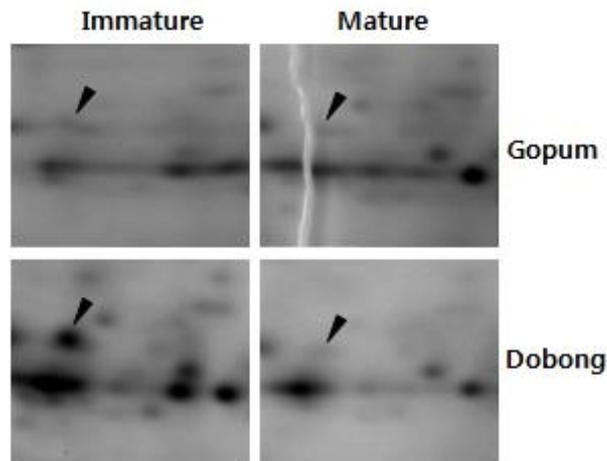


Figure 2-36. Proteomic analysis of ascorbate peroxidase b (*OsAPxb*) in immature and mature seeds. Total proteins were extracted from Gopumbyeo and Dobongbyeo and separated by two dimensional gel electrophoresis. Protein spots were identified by MALDI-TOF MS. Arrowhead indicate *OsAPxb*.

OsAPxb 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 ascorbate peroxidase 효소가 보유하는 heme 결합 motif를 보유하고 있으며 기존에 밝혀진 ascorbate peroxidase와 상동성 측면에서 진화적인 계통을 조사한 결과 애기장대를 포함한 식물군과 매우 유사함을 알 수 있었다 (Figure 2-37).

(A)

```

MGSKSYPTVSD EYLAAV GKAKR KLRGLTAEKNCAPLMRLAWHSA 45
GTEDVSSRTG GPF GTMKNP GDQSHAANAGLD IAVRLLDPI KDQLP 90
ILSYADFYQLAGVVAVEVTGGPEVPFHPGRQDKPEPPPEGRLPDA 135
TQGS DHLRQVFSACMG LSDKDI VALSGGHTLGRCHKERSGFEGAW 180
T SNP LIFDINS YFTELVSGEKEGLLQLPSDKALMADPAFRP LVEKY 225
AAEDDAFFADYAE AHLKLSELGFAEE 251

```

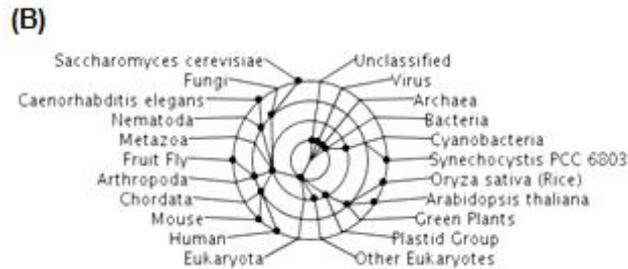


Figure 2-37. Deduced amino acid sequences of OsAPxb (Accession number: AB050724) (A). Active site (34th to 45th aa) and heme binding motif (157th to 166th aa) are underlined. Taxonomic lineage of ascorbate peroxidases of various species (B).

Real Time RT-PCR을 방법을 이용하여 발현양상을 조사한 결과 잎 조직에서 가장 높은 발현 양상을 보였으며 성숙이 완료되기 전에 발달 단계에 있는 종자에서도 발현이 강하게 되는 것을 알 수 있었다 (Figure 2-38).

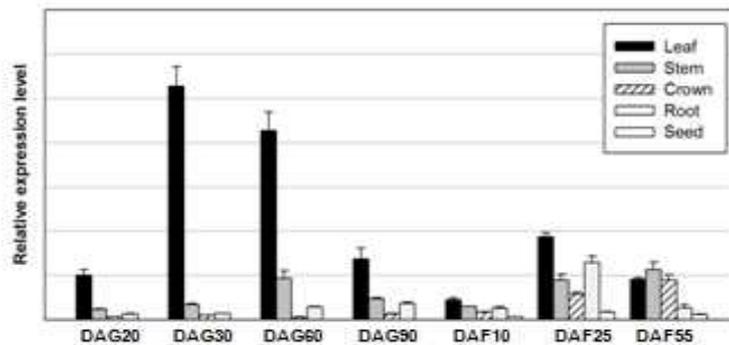


Figure 2-38. Expression profile of the OsAPxb during development. Total RNA was isolated from developing rice organs at indicated time points and then used for real time RT-PCR. DAG, Day After Germination; DAF, Day After Flowering.

Osapxb 돌연변이의 발달을 조사한 결과 키와 다른 발달은 야생형과 큰 차이는 없지만 종자 발달에 있어서 많은 차이를 보였다. 특히 종자 발달에 있어서 한 가지가 아닌 세 가지의 서로 다른 발달 양상을 보였는데 정상적인 발달 양상을 보이는 타입과 단위 이삭 당 종자 수가 감소하면서 종자 발달이 비정상적인 타입, 그리고 종자 자체가 발달이 되지 않는 타입 즉 불임이 되는 세가지 타입의 종자 발달 양상을 보였다 (Figure 2-39).

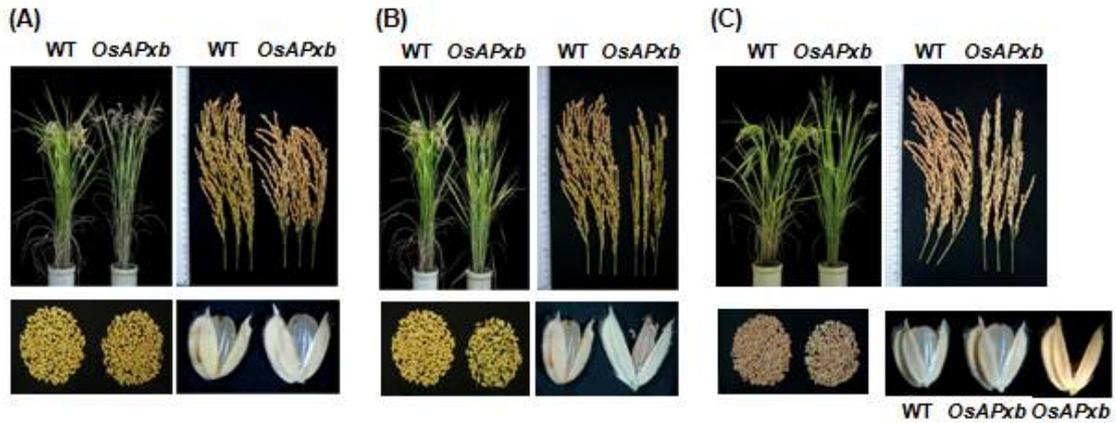


Figure 2-39. Phenotype of OsAPxb mutant. (A) Phenotypic analysis of these OsAPxb mutants. (B) Short panicle phenotype of field-grown OsAPxb mutant. (C) Aborted seed phenotype of OsAPxb mutant. (D) Half aborted seed phenotype of OsAPxb mutant

단백질체학을 통해서 동정한 단백질 중에서 네번째는 glycyl tRNA synthetase (GlyRS)로서 개화를 조절하는 기능을 갖는 단백질이다. GlyRS 단백질의 경우 미성숙 종자에서는 발현이 거의 되지 않지만 성숙된 종자에서는 고식미와 저식미에서 많은 양이 축적되는 양상을 보였다 (Figure 2-40).

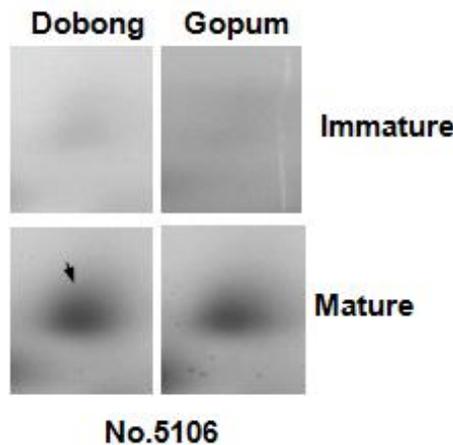


Figure 40. Proteomic analysis of glycyl tRNA synthetase (GlyRS) in immature and mature seeds. Total proteins were extracted from Gopumbyeo and Dobongbyeo and separated by two dimensional gel electrophoresis. Protein spots were identified by MALDI-TOF MS. Arrowhead indicate glycyl tRNA synthetase.

Osglyrs 돌연변이의 발달 양상을 조사한 결과 야생형에 비해서 개화가 약 35일정도 빨리됨을 알 수 있었다 (Figure 2-41A). 따라서 기존에 개화 조절에 관여하는 것으로 알려진 유전자들의 발현 양상을 조사하였는데 실제로 Osglyrs 돌연변이에서 개화를 촉진하는 Hd1 (Heading date 1), Hd3a (Heading date 3a), OsMADS50, OsMADS51 유전자들의 발현이 유도 되어있음을 알 수 있었다 (Figure 2-41).

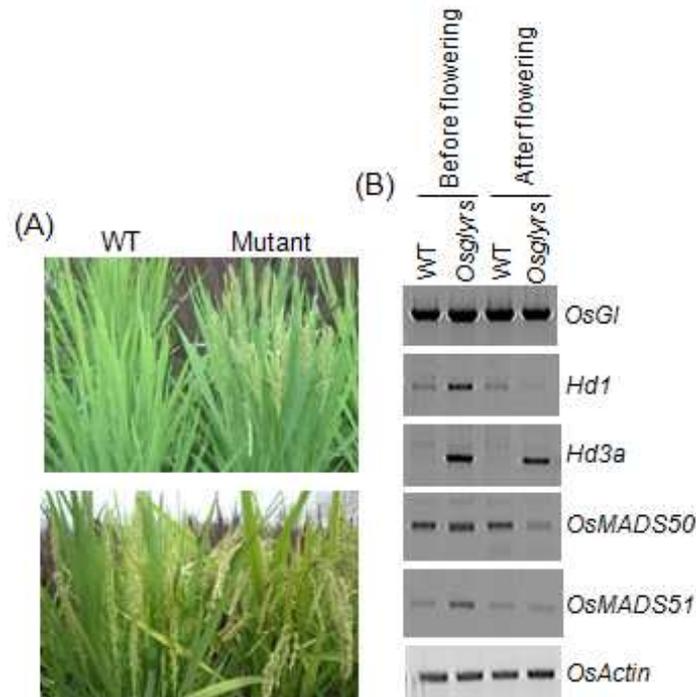


Figure 2-41. Osglyrs mutant shows early flowering. (A) Phenotypic analysis of the field-grown Osglyrs mutant. (B) Genes involved in early flowering were induced in Osglyrs mutant. OsGI, a rice GIGANTEA homolog : Hd1 (Heading date 1), a rice ortholog of Arabidopsis CO gene; Hd3a (Heading date 3a), a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene; OsMADS50, a rice ortholog of Arabidopsis SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1); OsMADS51, a type I MADS-box gene in the short-day (SD) promotion pathway in rice.

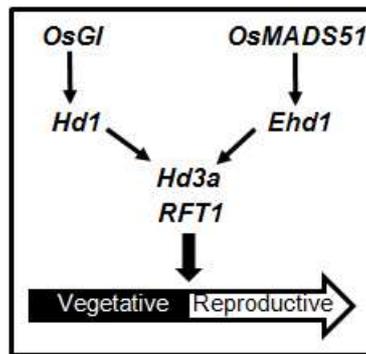


Figure 2-42. Schematic diagram about how gene expression system regulates the phase change of vegetative growth to reproductive growth in rice.

개화 촉진 양상을 조사한 결과 기존에 밝혀진 Hd1 (Heading date 1, a rice ortholog of Arabidopsis CO gene)과 Hd3a (Heading date 3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene) 유전자가 관여하는 경로를 따르는 것을 알 수 있었다 (Figure 2-42). 종자 발달 단계에서 mRNA 발현 양상을 고식미와 저식미의 종자를 이용해서 조사한 결과 상대적으로 저식미의 경우 성숙된 종자에서 많은 양의 mRNA가 발현됨을 알 수 있었으며 다른 발달 단계에서는 비교적 비슷한 양상을 보였다 (Figure 2-43).

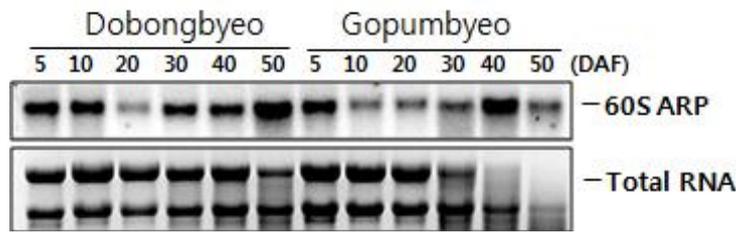


Figure 2-43. Expression pattern of the 60SRP gene during seed development. Total RNA was isolated from developing seeds at indicated time points and separated on formaldehyde-agarose gel. After electrophoresis, total RNA was transferred onto nylon membrane. The membrane was hybridized with ^{32}P -labeled OsGlyRS, washed with proper solution and then exposed on X-ray film. DAF, Day After Flowering.

단백질체학을 통해서 동정한 단백질 중 여섯번째는 60S acidic ribosomal protein (60SARP)로서 종자발달 조절에 관여하는 기능을 갖는 단백질이다. 60SARP 단백질의 경우 미성숙 종자에서는 발현이 거의 되지 않지만 성숙된 종자에서는 많은 양이 축적되는 양상을 보였다. 전체적인 mRNA 발현 양상 역시 다른 조직이나 기관에 비해서 성숙된 종자에서 가장 강한 발현 양상을 보였다 (Figure 2-44).

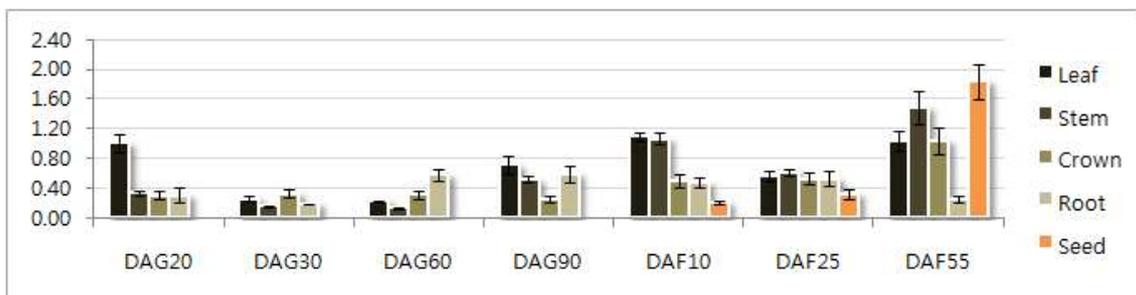


Figure 2-44. Expression profile of the 60SRP during development. Total RNA was isolated from developing rice organs at indicated time points and then used for real time RT-PCR. DAG, Day After Germination; DAF, Day After Flowering.

기존의 연구 결과들과 본인이 연구한 결과에 의하면 PDI 단백질과 BIP 단백질은 저장단백질의 안정성을 조절하여 저장단백질의 함량 조절에 관여할 것으로 예측 되었다. 따라서 본 연구에서는 이들 단백질들에 대한 항체를 제작하여 다양한 품종의 고식미와 저식미의 종자에서 이들 단백질의 함량과 식미와의 상관관계를 조사하였다.

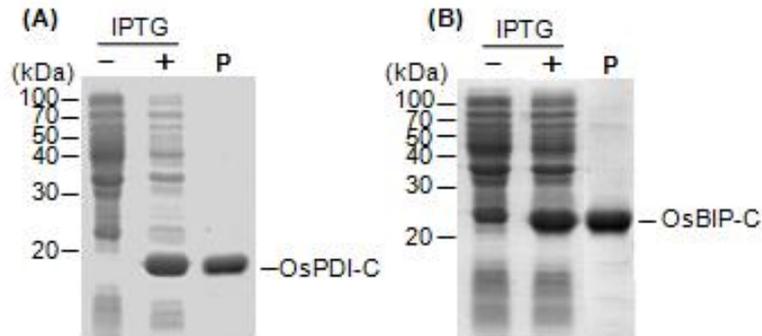


Figure 2-45. Expression and purification of C-termini of OsPDI and OsBIP proteins. cDNA fragments encoding of OsPDI and OsBIP C-termini were amplified by PCR, digested with proper restriction enzymes, and then cloned into E.coli expression vector, pET28a. Recombinant plasmids were introduced into BL21 cells to over-express recombinant proteins. Transformed cells were cultured at 28°C until OD value at 260 nm is reached to 1.0 and then treated with 0.5M of IPTG for 5 hours. Cells were harvested and disrupted by ultrasonic tip. OsPDI-C and OsBIP-C were purified with nickel affinity column according to Manufacturer's instruction. To produce antibody, the purified recombinant protein was injected subcutaneously into one rabbit. Incomplete adjuvant was used in all subsequent injections..

본 연구를 수행하기 위해서 먼저 이들 단백질을 대장균에서 과다발현하고 affinity column 을 이용하여 순수분리 하였다 (Figure 2-45). 분리한 단백질들을 토끼에 주입하여 항체를 제작 하여 식미가 서로 다른 9가지의 품종의 종자에서 PDI 단백질과 BIP 단백질의 함량과 식미와의 상관관계를 조사하였다. 그러나 예측과는 달리 PDI 단백질과 BIP 단백질의 함량과 식미와는 밀접한 관계를 보이지 않았다 (Figure 2-46).

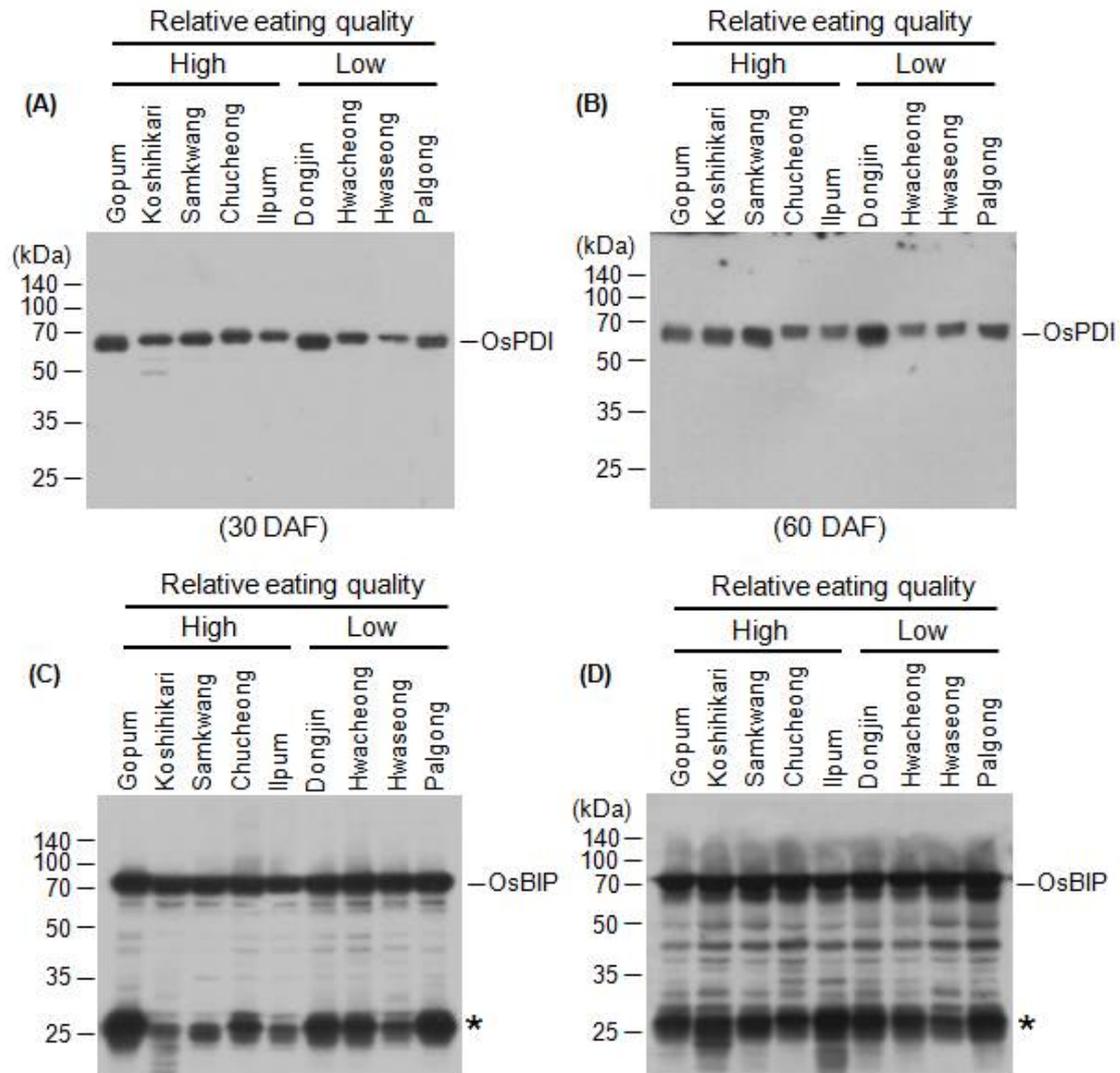
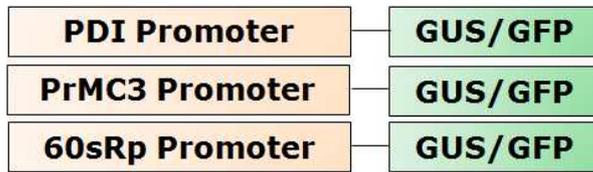


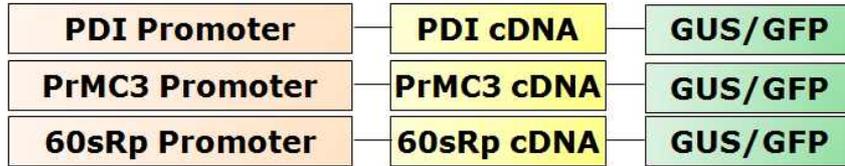
Figure 2-46. Examination of OsPDI and OsBIP levels in the seeds of nine rice cultivars. Seeds of nine rice cultivars which have different eating quality were raised in the field. Seeds were collected 30 and 60 days after flowering and then ground with sea sand in liquid nitrogen. Protein amount was quantified by Bradford method. Equal amount of protein was loaded and separated by 10%PAGE containing SDS, and transferred onto PVDF membrane. Membranes were treated with anti-OsPDI or anti-OsBIP antibody and subsequently with secondary antibody. OsPDI and OsBIP protein bands were detected with ECL detection kit according to Manufacturer's instruction. DAF, days after flowering. Asterisks may indicate non-specific bands.

한편 발달과 종자 발달에 있어서 PDI, PrMC3, 60SARP 단백질들의 기능을 밝히기 위해서 이들 단백질들을 코딩하는 유전자의 프로모터에 GUS나 GFP 유전자를 또는 cDNA가 fusion된 재조합 유전자를 제작하여 벼에 도입하였다 (Figure 2-47). 현재 이들 재조합 유전자가 도입된 형질 전환체를 선별하고 분석중이다.

□ **Vector : pMDC162/pMDC107**



□ **Vector : pMDC162/pMDC107**



□ **Vector : pCAMBIA1300**

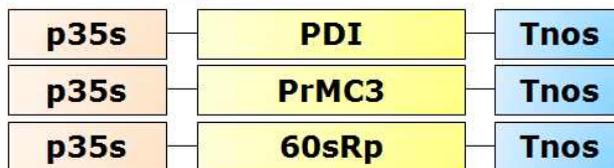


Figure 2-47. Construction of plant expression vector to examine functions, expression and localization patterns of PDI, PrMC3 and 60SRP in rice.

제3절 <제1협동과제> 전분대사 관여 유전자 발굴과 재조합에 의한 벼 식미증진 계통 개발

1. 고품질 및 저품질미 일본형 벼 품종의 식미도에 관련된 요소들의 분자적 특성

가. 재료 및 방법

공시재료 및 DNA 추출

공시재료로는 자포니카 품종 중 일반적으로 고품질벼로 알려진 고시히까리, 고품벼, 일품벼, 삼광벼 등 4개와 저품질벼인 팔공벼, 삼남벼, 신금오벼, 도봉벼 4개를 이용하였다. 이중 고시히까리는 일본 품종이며 나머지 7개는 한국 품종이다. 이들 품종은 각각 자포니카 품종 사이에서 높은 식미와 낮은 식미를 나타내기 때문에 실험에 이용하였다 (Lestari et al. 2009). 모든 품종은 2009년 5월 2일 온실에 파종하였고 2009년 6월 1일 충북대학교 실험 포장에 이식하였다. 관수, 관비, 살충제, 살균제 등 모든 재배는 충북대학교 실험 농장에서 사용하는 표준방법을 이용하였다. 재배하는 과정에서 분얼기에 있는 잎을 DNA 추출에 이용하였다.

벼 재배 포장에 재배 중인 벼 식물체로부터 분얼기에 소량의 잎을 채취하여 DNA를 추출하였다(Cho et al. 2009). 벼 잎 0.2g을 2 ml tube에 넣고, 액화질소를 이용하여 곱게 마쇄한 후 DNA 추출 용액 (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM EDTA, Sodium bisulfate 0.38g/100 ml) 900 μ l 를 첨가하여 유봉으로 잘 혼합한 후, chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 1 ml를 첨가하여 10분간 흔들어 잘 혼합한 다음 3,500 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 분리한 후 동일 양의 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1)를 첨가하여 10회 정도 흔들어 준 후, 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 1.5 ml tube에 옮긴 다음 2 μ l의 RNase(10mg/l)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 2/3~1 volume의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 응축시킨 다음 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시킨 후, 70% 에탄올로 세척하고, 12,000 rpm으로 5분간 다시 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 DNA를 풍건시킨 다음 50 μ l의 TE에 DNA를 녹여서 PCR 분석에 이용하였다. 추출한 DNA를 10~50배로 희석한 다음 시료당 20 ng을 취하여 PCR 분석에 이용하였다.

Primer design, PCR 및 염기서열 분석

Sbe1, Sbe3, waxy(GBSS1), SSS1, SSS2A(ALK), SSS3A, SSS4A, ISA1 유전자의 프로테인 시퀀스를 이용하여 BLASTP 프로그램을 통해 DNA 염기서열을 확인한 결과 Gramene에 등록된 각각의 유전자 번호는 LOC_Os06g51084, LOC_Os02g32660, LOC_Os06g04200, LOC_Os06g06560, LOC_Os06g12450, LOC_Os08g09230, LOC_Os01g52250, LOC_Os08g40930 임을 확인하였다 (<http://www.gramene.org>). DNA 시퀀스를 얻은 후 Primer3 online software를 이용하여 프라이머를 고안하였고 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), Oligo 6 software에서 검토하였다. 추출한 DNA를 10~50배로 희석한 다음 시료당 20 ng을 취하여 PCR 분석에 이용하였다. 각각의 유전자는 20 mM Mg²⁺가 포함된 10×buffer 5 μ l, dNTP

mixture (2.5mM each) 4 ul, Ex Taq polymerase (TaKaRa) 1.25 unit, 10 uM 농도인 forward, reverse 프라이머 각각 1 ul 를 이용하여 증폭하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 hot step, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 과정을 25 cycle 반응시킨 후, 72°C에서 5분간 마지막 extension의 프로그램으로 PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research Inc., CA, USA)를 사용하여 증폭하였으며 1% agarose gel 상에서 PCR 산물을 확인하였다. 확인된 PCR 산물은 DNA purification kit (Expin PCR SV, GeneAll)을 이용하여 정제한 후 COSMO Genetech에서 시퀀스 분석을 수행하였다. 8개의 벼 품종의 DNA 시퀀스는 DDBJ website의 CLUSTALW를 이용하여 분석하였다.

Quantitative real-time RT-PCR 분석

벼 미숙종자로부터 총 RNA의 분리는 RNeasy mini kit(Qiagen)의 회사에서 제공하는 실험 방법을 약간 수정하여 수행하였다. 100 mg의 곱게 분쇄한 동결분말을 1.5 ml 튜브에 넣고 600 µl RLC buffer를 가하여 즉시 vortex로 강하게 섞어준 다음 지체 없이 13,000 rpm에서 2 분 동안 원심분리하였다. 상층액을 lilac spin column으로 용액이 굳지 않도록 신속히 옮기고 12,000 rpm에서 2분 동안 다시 원심분리하였다. 원심분리 후에 column을 통하여 분리한 추출 물을 정제하기 위하여 100% 에탄올 280 µl 를 가하고 4-5회 피펫으로 혼합한 다음 pink RNeasy spin column으로 옮겨 10,000 rpm에서 1 분 동안 원심분리하였다. 다시 pink RNeasy spin column에 700 µl의 RW1 buffer를 가하고 10,000 rpm에서 1 분 동안 원심분리하였다. 그 다음 RNA의 세척을 위하여 500 µl의 RPE buffer를 가하고 10,000 rpm에서 1 분 동안 원심분리하는 과정을 2회 반복하고 여분의 RPE buffer를 완전히 제거하기 위하여 10,000 rpm에서 2 분 동안 원심분리하였다. RNA의 회수를 위하여 50 µl 의 RNase-free water를 pink spin column에 가한 다음 10,000 rpm에서 1 분 동안 원심분리하였다. RNA의 농도는 Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc. USA)를 사용하여 정확한 농도를 측정하였으며, 즉시 -80°C에 보관하였다.

RT-PCR을 수행하기 위하여 cDNA의 합성은 다음과 같이 수행하였다. 총 RNA는 DNase 1 kit (Cat. No: 18068-015, invitrogen)를 사용하여 정제를 하였고, first-strand cDNA의 합성은 Oligo(dT)20 primer와 SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Cat. No:18080-051, Invitrogen)를 사용하여 mRNA를 cDNA로 합성하였다.

RT-PCR에 사용할 프라이머를 conserve region으로부터 제작하기 위하여 Sbe1, Sbe3, GBSS1, SSS1, SSS2A, SSS3A, SSS4A, ISA1 enzyme 유전자의 프로테인 시퀀스를 NCBI/BLAST website에서 blast 분석을 수행하여 다양한 품종의 프로테인 시퀀스를 획득한 후 clustalw(DDBJ/CLUSTALW website) 분석을 수행하여 유전자들의 conserved domain을 찾을 수 있었고 그로부터 RT-PCR을 위한 프라이머를 Primer3 online software(http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)를 이용하여 고안하였고 Oligo 6 software에서 검토하였다. Quantitative real-time RT-PCR은 double-strand DNA에 결합할 수 있는 SYBR Green, a fluorophore (F-410L, qPCR kit from FINNZYMES, Finland)를 이용하여 DNA Engine Opticon 2(MJ Research, Waltham, MA)을 통

해 수행하였다. 사용한 cDNA의 균일 함량을 체크하기 위한 내부 마커로서 Actin-1 유전자 (GenBank Accession No. AK071586.1)를 사용하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 8분간 hot step, 94°C에서 33초간 denaturation, 55°C에서 32초간 annealing, 72°C에서 22초간 extension 과정을 39 cycle 반응시킨 후, 72°C에서 5분간 마지막 extension의 프로그램으로 PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research Inc., CA, USA)를 사용하여 증폭하였다. 마지막으로 상대적인 유전자 발현 정도는 internal Actin-1 mRNA를 이용해 표준화한 2-ddCt method(Livak and Schmittgen, 2001)를 이용하여 분석하였다.

SBE 효소 활성 분석

벼 종자에서 Sbe1, Sbe3 및 Sbe4 동위효소들의 효소활성 분석은 여러 보고에서 사용한 방법(Nakamura et al. 1989; Yamanouchi and Nakamura 1992; Li et al. 1997; Zhao et al. 2005; Zhao et al. 2007)을 종합하고 변형하여 수행하였다. 동결 보존되어 있던 벼 종자 1g을 취하여 종피와 배를 제거하고 배유만을 분리하여 미리 차갑게 한 유발에 넣고 4 ml의 차가운 추출 buffer (50mM HEPES-NaOH pH 7.4, 4mM MgCl₂, 50mM 2-mercaptoethanol, 12.5%(v/v) glycerol)를 가하여 유봉을 사용하여 얼음 위에서 곱게 마쇄하였다. 마쇄한 배유를 미리 차갑게 한 40 ml 튜브에 넣고 6 ml의 추출 buffer를 사용하여 2회 유발을 세척하여 40 ml 튜브에 넣고 15,000 rpm, 2°C에서 20 분 동안 원심분리하였다. 상층액을 Whatman filter(0.45µm, Whatman, LTD)를 통하여 수집한 다음 그 용액을 효소활성의 측정에 사용하였다.

Starch branching enzyme 효소의 활성은 토끼 근육 phosphorylase에 의하여 glucose-1-P를 α-glucan 합성을 촉매하는 반응과정을 분석 측정하였다 (Hawker et al. 1974; Nakamura et al. 1989). 앞에서 준비한 400 µl의 효소 추출액을 400 µl의 차가운 반응 buffer (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 50 mM glucose-1-P, 2.5 mM AMP, 4.8 units phosphorylase)에 넣고 혼합한 다음 30°C에서 30 분 동안 반응시켰다. 효소의 반응은 50 µl 1M HCl과 1 ml dimethylsulfoxide, 1.5 ml fresh iodine-potassium iodide 용액(2g KI+ 200 ml distilled water + 0.2g I₂)을 넣고 혼합하여 30°C에서 60 분 동안 암 조건에서 반응시켜 반응을 중지하였다.

Sbe 효소의 활성은 분광흡광도계(HP 845x UV-visible system)의 540 nm에서 흡광도를 조사하여 분석하였다. 분석에 사용한 표준용액은 다음과 같이 준비하였다. 400 µl의 효소 추출액을 50 µl 1M HCl과 잘 혼합하고 400 µl의 차가운 반응 buffer를 가하여 혼합하였으며 다른 과정은 앞의 시료와 동일하게 처리하였고, 무처리 용액은 400 µl의 효소 추출액 대신에 400 µl의 차가운 반응액 만을 첨가하였고 다른 과정은 시료와 동일하게 처리하였다. Sbe1 효소활성의 계산은 다음과 같이 하였다. Sbe1 효소활성(%)=((시료 OD₅₄₀-표준액 OD₅₄₀)/표준액 OD₅₄₀)×100로 하여 계산하였는데, OD₅₄₀에서 흡광도 1% 수준에서의 증가를 Sbe1 효소활성 (Units/g/min)의 1 unit으로 정의하였다. 또한, 모든 시료는 3반복으로 하여 분석을 수행하였다.

GBSS1와 soluble starch synthase 활성 분석

Starch granule 은 Nakamura et al.(1998)과 Umemoto and Terashima(2002) 등에서 사용된 방법을 종합하고 변형하여 수행하였다. 동결 보존되어 있던 벼 종자 0.5g 을 취하여 종피와 배를 제거하고 배유만을 분리하여 미리 차갑게 한 유발에 넣고 1 ml의 차가운 추출 buffer (100 mM Tris pH 7.2, 2 mM EDTA, 2mM DTT, and 10%(v/v) ethanediol)를 가하여 유봉을 사용하여 얼음 위에서 곱게 마쇄하였다. 마쇄한 배유를 미리 차갑게 한 40 ml 튜브에 넣고 6 ml의 추출 buffer를 사용하여 2회 유발을 세척하여 40 ml 튜브에 넣고 15,000 rpm, 4°C에서 20 분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 추출 buffer를 이용하여 3번 세척한 후 starch granule을 4°C에서 건조하였다. 건조된 starch granule을 1ml의 추출 buffer를 이용하여 녹인 후 그 용액을 효소활성의 측정에 사용하였다.

벼 종자에서 soluble starch synthase 효소활성 분석은 Nakamura et al.(1989)에서 사용된 방법을 변형하여 수행하였다. 동결 보존되어 있던 벼 종자 1g 을 취하여 종피와 배를 제거하고 배유만을 분리하여 미리 차갑게 한 유발에 넣고 4 ml의 차가운 추출 buffer (100 mM Tricind-NaOH pH 8.0, 8 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 50 mM 2-mercaptoethanol, 12.5%(v/v) glycerol, and 5%(w/v) insoluble polyvinyl pyrrolidone 40) 를 가하여 유봉을 사용하여 얼음 위에서 곱게 마쇄하였다. 마쇄한 배유를 미리 차갑게 한 40 ml 튜브에 넣고 6 ml의 추출 buffer를 사용하여 2회 유발을 세척하여 40 ml 튜브에 넣고 15,000 rpm, 4°C에서 20 분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 추출 buffer를 이용하여 3번 세척한 후 starch granule을 4°C에서 건조하였다. 건조된 starch granule을 1ml의 추출 buffer를 이용하여 녹인 후 그 용액을 효소활성의 측정에 사용하였다.

GBSS1과 soluble starch synthase 효소 활성 분석은 Nakamura et al.(1989)와 Zhao et al.(2005)이 사용한 방법을 변형하여 수행하였다. 앞에서 준비한 150 µl의 효소 추출액을 차가운 반응 buffer (50 mM HEPES-NaOH pH7.4, 1.6 mM ADPglucose, 1 mg amylopectin, 15 mM DTT)에 넣고 혼합한 다음 GBSS1 분석을 위해 25°C에서 20 분 동안 반응시켰고, soluble starch synthase 효소 활성 분석을 위해 30°C에서 20 분 동안 반응시켰다. 효소 반응은 끓는 물에 30초간 두어 반응을 중지시켰다. 효소 반응을 중지한 후 0.1 ml의 용액 (50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 5 mM PEP, 200 mM KCl, 10 mM MgCl₂, and 1.5 units of pyruvate kinase)을 넣고 혼합하여 30°C에서 30 분 동안 처리한 후 15,000 rpm, 4°C에서 5 분 동안 원심 분리하였다. 300ul의 상층액을 300ul 반응액 (50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 10 mM glucose, 20 mM MgCl₂, 2mM NADP)과 혼합하여 23°C에서 5분간 반응시켜 각각 2 µl hexokinase(2.8 units)와 G-6-P dehydrogenase (0.7 units)를 첨가한 후 340nm에서 GBSS1과 soluble starch synthase 효소 활성을 측정하였다.

식미도 및 관련 형질 조사

벼 종실을 91% 백미로 도정을 하여 식미도 및 관련 성분의 분석에 이용하였다 (Peng et al. 2006; Lestari et al. 2009). 식미도의 검정은 TOYO 식미계 (Toyo taste meter, model MA-90)를 사용하여 제조회사의 분석방법(Toyo Rice Polishing Machine Factory, Japan)에 따라 분석하였다. 단백질 함량은 micro-Kjeldahl 방법(Cunniff 1995)을 사용하였고 측정된 값을 질소 계수 5.95를 곱하여 환산하였다. 백미의 아밀로스 함량은 100-mesh 쌀가루 호화용액의 starch-iodine 색도의 비교흡광도를 측정하여 구하였다 (Perez and Juliano, 1978). 알칼리붕괴도(ADV)는 Little et al. (1958)의 알칼리붕괴도 실험법과 spreading score방법에 따라 수행하였다. RVA pasting properties은 Rapid Visco Analyzer(RVA)를 사용하여 제조회사의 분석방법(NewPort Sci. Co., Australia)에 따라 분석하였다. 벼의 전분 paste profile은 다음과 같은 7가지 요소들에 대하여 조사하였다; Peak viscosity (PV), hot paste viscosity (HPV), cool paste viscosity (CPV), breakdown viscosity (BDV=PV-HPV), setback viscosity (SBV= CPV-PV), consistency viscosity (CTV=CPV-HPV) (Bao and Xia, 1999; Shen et al., 2006) 및 호화온도. 모든 viscosity parameters는 Rapid Visco Units(RVU)으로 나타내었다.

나. 결과 및 고찰

(1) 전분합성 관련 유전자들의 PCR 단편의 변이

전분대사 중에서 amylose와 amylopectin 합성에 관련된 주요 효소인 Sbe1, Sbe3, Waxy 유전자의 genomic DNA sequence level에서 고품질미 및 저품질미 벼 품종들 간의 차이점을 분석하기 위하여 이들 효소 유전자 ORF의 variable region으로부터 Sbe1과 Sbe3는 각각 4개 부위에서, Waxy는 2개 부위로부터 총 10 set의 primer를 합성하여 genomic PCR을 수행한 결과는 **Figure 1**에 나타낸 바와 같다.

Sbe1, Sbe3, Waxy 유전자의 genomic sequence는 각각 Sbe1 (LOC_Os06g51084)은 8,440 bp, Sbe3 (LOC_Os02g32660)은 11,380 bp, Waxy (LOC_Os06g04200)는 5,035 bp로서 너무 길기 때문에 실제로는 Sbe1 6개, Sbe3 5개, Waxy 3개의 PCR 밴드를 증폭하였으나 아가로스 겔 상에서는 모두 같은 크기의 밴드를 보여서 여기에서는 예로서 10개의 PCR 결과만을 **Figure 3-1**에 제시하였다.

Genomic PCR 증폭에서 Sbe1 유전자는 525 bp, 852 bp, 1,059 bp, 1,799 bp의 밴드를 얻었으나 모든 증폭 밴드에서 고품질 및 저품질 벼 품종들 간에 차이를 보이지 않았고, Sbe3 유전자는 1,715 bp, 1,818 bp, 1,925 bp, 2,148 bp의 밴드를 얻었으나 역시 모든 증폭 밴드에서 고품질 및 저품질 벼 품종들 간에 차이를 보이지 않았다. Waxy 유전자의 경우에도 두 개의 primer sets로부터 1,005 bp와 1,472 bp의 밴드를 얻었으나 모든 증폭 밴드에서 고품질 및 저품질 벼 품종들 간에 차이를 보이지 않았다.

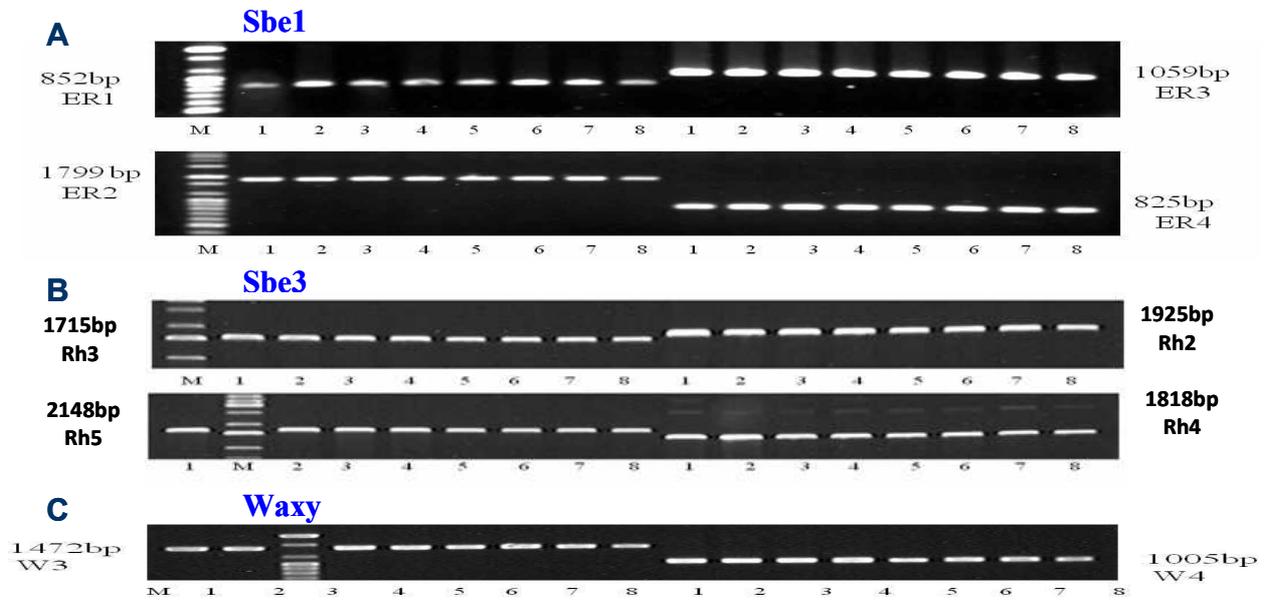


Fig. 3-1. PCR amplification of Sbe1, Sbe3, and Waxy genes (A, Sbe1; B, Sbe3; C, Waxy) using ten primer sets designed from variable regions of each gene in 4 high- and 4 low-quality rice varieties. High: 1, Gopum 2, Ilpum 3, Samgwang 4, Koshihikari, Low: 5, Palgong 6, Samnam 7, Singeumo 8, Dobong.

(2) Genomic PCR 단편의 염기서열 변이

Genomic PCR 증폭에서 품종간에 밴드의 차이를 보이지 않았던 증폭된 DNA를 염기서열의 차이를 검토하기 위하여 Sbe1, Sbe3 및 Waxy 유전자에서 증폭된 모든 밴드를 sequencing 하여 clustalw 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교 분석하였다.

Sbe1 유전자는 **Figure 3-2**에 나타낸 바와 같이 12개의 SNP가 발견되어 비교적 많은 변이가 존재함을 알 수 있었으나 고품질미 품종과 저품질미 품종 간에 상관관계를 보이지 않았다. Waxy 유전자에 있어서는 **Figure 3-3**에 나타낸 바와 같이 유전자 전체적으로 매우 변이가 적어 1개의 SNP만이 발견되었으나 고품질미 품종과 저품질미 품종 간에 상관관계는 좀더 검토가 필요한 것으로 생각되었다.

3-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	3-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AGATG
4-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	4-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AAATG
2-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	2-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AAATG
1-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	1-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AAATG
0-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	0-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AAATG
7-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	7-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AAATG
5-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	5-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AAATG
6-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	6-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AAATG
8-R2-Fw	AAAAATATGGATTGAATACAATGAATCTATACATTA AAAAATATCGTATTGAATTA	8-R2-Fw	ATAGGGACAGCCCTCATTCAACCTTTGAGGACTCTAAAATAGGGACTACTGCTGG AAATG
	*****		*****
3-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	3-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
4-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	4-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
2-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	2-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
1-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	1-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
0-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	0-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
7-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	7-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
5-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	5-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
6-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	6-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
8-R2-Fw	TTACTATGTTAAACTAGGTGAAGCATA AGTATAATCA AAAAATACA AGAAAAAGAAA	8-R2-Fw	CTCTAACACCCCTGTTCCCCCTTGTCTGGTG GAAAAACCCCTTCCAGTCTCTCTGTTTATG
	*****		*****
3-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	3-R2-Fw	CGATGGTGGGCTCTTCC GACGTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
4-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	4-R2-Fw	CGATGGTGGGCTCTTCC GACGTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
2-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	2-R2-Fw	CGATGGTGGGCTCTTCC GACGTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
1-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	1-R2-Fw	CGATGGTGGGCTCTTCC GACGTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
0-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	0-R2-Fw	CGATGGTGGGCTCTTCC GACGTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
7-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	7-R2-Fw	CGATGGTGGGCTCTTCC GACGTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
5-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	5-R2-Fw	CGATGGTGGGCTCTTCC GACGTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
6-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	6-R2-Fw	CGATGGTGGGCTCTTCC GACGTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
8-R2-Fw	TGGGGCTAA AAATAGGGTCTGCTGTA AGTGGAGTA TTTTGAATCTTAA AAAA	8-R2-Fw	CAATGGTGGGCTCTTCC AGCTGTCACCTTCTCAAGGCATCGT TTTTGGA AAAA
	*****		*****

Fig 3-2. SNP screening of Sbel gene between 4 high- and 4 low-quality rice varieties. 0. Nipponpare; (High) 1. Gopum; 2. Ilpum; 3. Samgwang; 4. Koshihikari; (Low) 5. Palgong; 6. Samnam; 7. Singeumo; 8. Dobong. Marked parts are located in intron 5 of Sbel gene.

0-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	0-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
2-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	2-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
6-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	6-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
3-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	3-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
1-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	1-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
5-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	5-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
4-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	4-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
7-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	7-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
8-W2-Rv	GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAAGGAGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTCCGGTC	8-W2-Rv	TAATATAACTACACTACAAGACACACTTGCACGATATGCCAAAAATTCAGAACAAATTCAG
	*****		*****
0-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	0-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
2-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	2-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
6-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	6-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
3-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	3-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
1-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	1-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
5-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	5-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
4-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	4-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
7-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	7-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
8-W2-Rv	GACAGAAAAATCCACTGATCGCGTTATCGGACGCTGGAGAACAGAAAGGCGCCCTGAC	8-W2-Rv	TGGCAAAAAAAAATCGAATATAGGGAAGGACCTAATAATCAATAATTAGAAGGG
	*****		*****
0-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	0-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
2-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	2-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
6-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	6-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
3-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	3-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
1-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	1-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
5-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	5-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
4-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	4-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
7-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	7-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
8-W2-Rv	GTGATGGCGCGCCATCCCGAGCTCATGAGGAGGACGTCCAGATCGTCTT CTGGTA	8-W2-Rv	GTGAGGCTTTGAACCCAGATCGTCTAGTCCACCACTTGTGGAGT TAGCCGGAAGACCTC
	*****		*****

Fig. 3-3. SNP screening of Waxy gene between 4 high- and 4 low-quality rice varieties. 0. Nipponpare; (High) 1. Gopum; 2. Ilpum; 3. Samgwang; 4. Koshihikari; (Low) 5. Palgong; 6. Samnam; 7. Singeumo; 8. Dobong. Marked parts are located in intron 5 of Waxy gene.

(3) 고품질 및 저품질 벼에서 SNP and InDel 비교

Genomic PCR에서 증폭된 DNA를 염기서열을 결정하여 고품질 벼와 저품질 벼에서 Sbe1 유전자 염기서열에 존재하는 SNP와 InDel의 분포를 조사한 결과는 Figure 3-4에 나타난 바와 같다.

고품질 벼와 저품질 벼에서 7~10, 12, 16~17, 20 및 22~24번 염기 부분에 차이가 있는 것을 분명히 알 수 있었다. 이 차이는 고품질 벼와 저품질 벼 간에 나타난 SNP (Figure 4에서 0, 5, 10, 15)와 IndDel (20)의 분명한 차이로서 품질의 차이와 어느 정도 관련이 있는 것으로 생각된다.

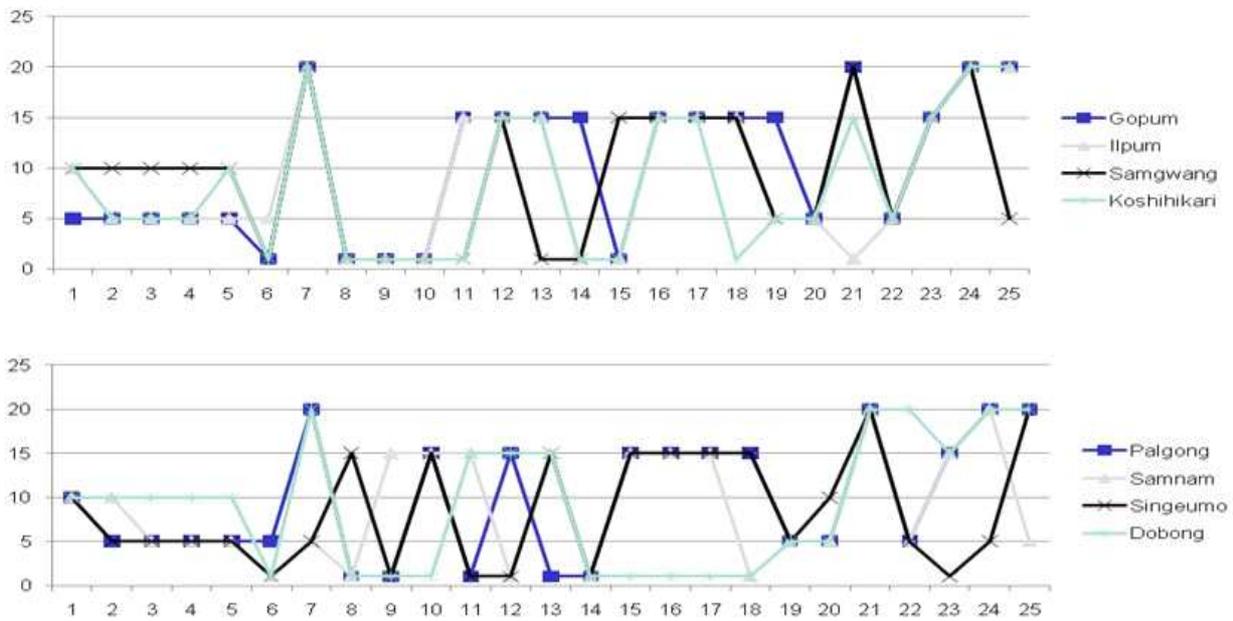


Fig. 3-4. Comparison of SNP (single nucleotide polymorphism) and InDel (Insertion-deletion length polymorphism) sites of Sbe1 in 4 high- and 4 low-quality rice varieties. 1-25 means 25 SNP and InDel sites; 0=A; 5=T; 10=C; 15=G; 20= -

(4) Sbe1, Sbe3 및 Waxy 유전자의 SNP와 InDel

Genomic PCR에서 증폭된 DNA를 염기서열을 결정하여 고품질 벼와 저품질 벼에서 Sbe1, Sbe3 및 Waxy 유전자의 염기서열에 존재하는 SNP와 InDel의 분포를 조사한 결과 Table 3-1, 3-2, 3-3에 보인 바와 같이 매우 흥미로운 결과를 얻었다.

Sbe1 유전자는 고품질 벼에서는 SNP와 InDel이 품종간에 같았으나 저품질 벼에서는 SNP와 InDel이 품종간에 차이를 보였다. Sbe1 유전자에 대하여 분석한 부분은 벼 6번 염색체의 30,903,151~30,898,881 bp 부위에서 염기서열의 변이를 분석한 결과로서 이 부위의 SNP와 InDel은 고품질 벼 군에서는 linkage -AAAGGGTTG- 의 패턴을 보이고 있는데, 팔공벼는 4번째 염기의 A가 G로, 삼남벼는 1, 3, 4, 5번째 염기가 -AAG에서 TGGA로, 신금오벼는 1, 2, 4, 5, 8, 10, 11번째 염기가 -AAGTG- 에서 TGGACAT로, 도봉벼는 6, 7, 9번째 염기가 GGT에

서 AA- 로 바뀌었다. 따라서, Sbe1 유전자의 DNA 염기서열의 경우에는 고품벼들의 linkage -AAAGGGTTG- 가 저품질 벼들에서는 TGGGAAAC-AT로 부분적으로 바뀌어 고품질 벼와 저품질 벼 품종들 간에 식미 품질 (palatability quality) 차이와 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 생각하였다.

Sbe3 유전자는 고품질 벼들에서는 2, 4, 6, 9번째 염기들이 linkage G--- 패턴을 보였으나, 저품질 벼들에서는 linkage G--- 가 ATTT로 부분적으로 바뀌었다.

Waxy 유전자는 부분적으로 염기서열을 결정하였다. 그 결과에 따르면 고품질 벼들에서는 4, 5, 7번 염기에서 linkage AGA였으나, 저품질 벼 중에서 도봉벼는 AGA가 CGA로, 삼남벼는 AAG로 바뀌었는데 팔공벼와 신금오벼에서는 SNP와 InDel이 발견되지 않았다.

Table 3-1. Discrimination of 4 high- and 4 low- quality rice varieties by SNP and InDel sites in Sbe1 LOC_Os06g51084 (Reverse strand on chromosome 6).

Rice variety	30,903,151	30,903,128	30,903,103	30,902,896	30,902,876	30,902,683	30,902,665	30,900,838	30900798	30898918	30898880 -30898881
Gopum	-*	A	A	A	G	G	G	T	T	G	-
Ilpum	-	A	A	A	G	G	G	T	T	G	-
Samgwang	-	A	A	A	G	G	G	T	T	G	-
Koshihikari	-	A	A	A	G	G	G	T	T	G	-
Palgong	-	A	A	G	G	G	G	T	T	G	-
Samnam	T	A	G	G	A	G	G	T	T	G	-
Singeumo	T	G	A	G	A	G	G	C	T	A	T
Dobong	-	A	A	A	G	A	A	T	-	G	-
Exon	2	2						6	6	9	
Intron			2	2	2	2	2				9

* AGTC : DNA base pairs, " - " : InDel.

Table 3-2. Discrimination of 4 high- and 4 low- quality rice varieties by SNP and InDel sites in Sbe3 LOC_Os02g32660 (Reverse strand on chromosome 6).

Rice variety	19,352,539	19,352,646	19,353,183	19,353,571	19,354,868	19,355,306	19,356,138	19,356,275	19,356,281	19,357,899	19,357,949
Gopum	-*	G	A	-	A	-	T	T	-	G	T
Ilpum	G	G	A	-	G	-	T	T	-	A	T
Samgwang	-	G	A	-	A	-	C	-	-		
Koshihikari	G	G	-	-	A	-	T	T	-	A	A
Palgong	G	G	A	T	A	-	T	T	-	G	T
Samnam	G	G	A	T	A	-	T	T	T		
Singeumo	-	G	A	-	A	T	T	T	-	A	T
Dobong	-	A	A	-	A	-	T	T	-	A	T
Exon							14				
Intron	6	6	8	9	11	11		14	14	15	15

* AGTC : DNA base pairs, " - " : InDel.

Table 3-3. Discrimination of 4 high- and 4 low- quality rice varieties by SNP and InDel sites in Waxy LOC_Os06g04200 (Forward strand on chromosome 6).

Rice variety	1,764,704	1,764,705	1,764,796	1,767,597	1,767,620	1,767,621	1,767,622	1,768,059
Gopum	T*	C	-	A	G	G	A	T
Ilpum	T	C	C	A	G	A	A	C
Samgwang	T	C	-	A	G	G	A	G
Koshihikari	-	-	-	A	G	G	A	C
Palgong	T	C	-	A	G	G	A	C
Samnam	T	C	-	A	A	G	G	T
Singeumo	T	C	-	A	G	G	A	C
Dobong	-	-	-	C	G	G	A	T
Exon	1	1		9	9	9	9	10
Intron			1					

* AGTC : DNA base pairs, " - " : InDel.

(5) Semi-quantitative RT-PCR에 의한 RNA 발현분석

벼의 등숙기에 쌀알의 발달과정에서 전분의 물리화학적 특성이 결정되는데 중요한 역할을 하는 Sbe1, Sbe3, SSS1, GBSS1 및 SSS2A 유전자들의 RNA 발현을 semi-quantitative RT-PCR에 의하여 검토하기 위하여 개화기부터 5일 간격으로 개화 후 25일까지 고품질 벼와 저품질 벼의 미숙종자를 채취하여 semi-quantitative RT-PCR로 분석한 결과는 **Figure 3-5**에 보인 바와 같다.

벼 품종들의 미숙종자에서 semi-quantitative RT-PCR에 의하여 분석한 RNA의 발현은 개화 후 10~20일에 가장 많은 발현을 보였는데, Sbe1, Sbe3, SSS1 및 SSS2A 유전자의 발현은 개화 후 10~20일에 고품질 벼들이 저품질 벼들에 비하여 발현량이 높았다. 저품질 벼들은 대체로 비교적 개화 초기인 5~15일에 발현이 높고 고품질 벼들은 개화 후 10~20일에 가장 많은 발현을 보여 RNA 발현에 바로 이어서 만들어지는 효소들의 작용이 쌀알의 왕성한 등숙시기에 집중됨으로써 고품질미의 형성에 효율적으로 작용하는 것으로 생각되었다. 아밀로스의 형성에 주된 역할을 하는 GBSS1 유전자의 경우에는 발현시기가 비교적 중후기인 개화 후 10~20일에 가장 많은 발현을 보였고 고품질 벼들에서는 다른 유전자들에 비하여 발현량이 상대적으로 저하되었으며 저품질 벼인 삼남벼에서 다른 품종들 보다 RNA 발현량이 증가됨을 볼 수 있었고 GBSS1 유전자의 발현이 Sbe1, Sbe3, SSS1 및 SSS2A 유전자의 발현 보다 중후기로 더 많이 발현하는 현상을 나타내었다. RNA 발현 분석에서 semi-quantitative RT-PCR에 의한 분석은 real-time PCR에 비하여 정확도가 떨어지므로 다음 항에서 real-time PCR에 의하여 RNA의 발현 분석을 실시하였다.

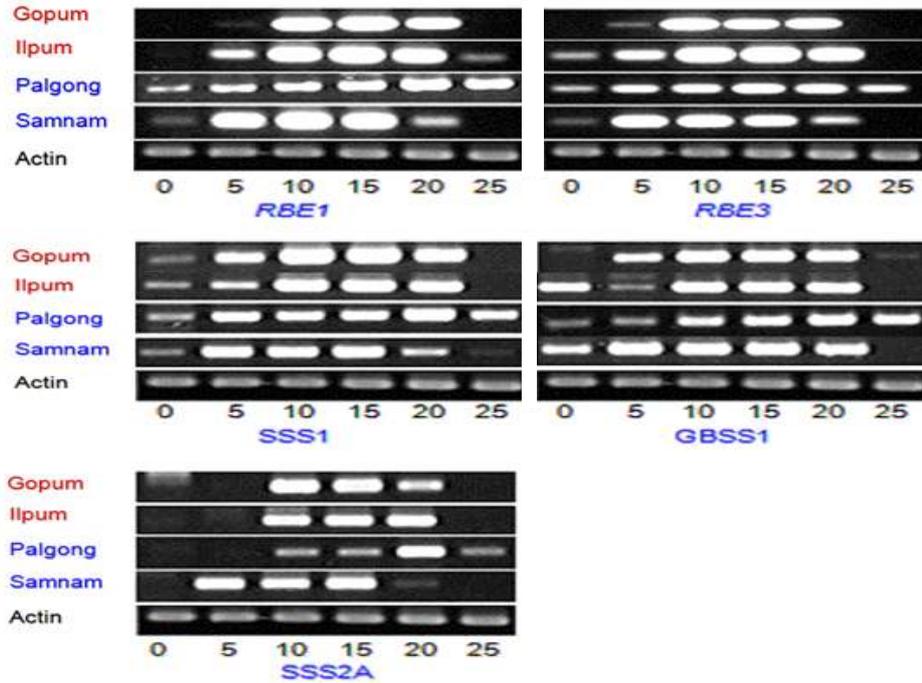


Fig 3-5. Expression profiles of Sbe1, Sbe3, SSS1, GBSS1, and SSS2A during rice seed development. Rice panicles were harvested at 0, 5, 10, 15, 20, and 25 days after flowering. 100 ng of first strand cDNA was used as template.

(6) Real-time RT-PCR에 의한 SBE, GBSS1, SSS, ISA, PUL 유전자의 발현분석

Semi-quantitative RT-PCR에 의한 RNA 발현 분석 결과를 좀 더 면밀히 검토하기 위하여 개화기부터 5일 간격으로 개화 후 25일까지 고품질 벼와 저품질 벼의 미숙종자를 채취하여 real-time PCR에 의하여 RNA의 발현 분석을 실시하고 있으나 현재 cDNA 합성까지 진행한 상태여서 아직 본 결과를 얻지 못하였다. 그래서 유사한 결과를 보고한 Ohdan et al. (2005)의 결과를 통하여 **Figure 3-6**과 같이 살펴보았다.

Ohdan et al. (2005)은 Semi-quantitative RT-PCR에 의하여 벼 종실에서 RNA 발현 분석을 위하여 개화기부터 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 일에 벼의 미숙종자를 채취하여 real-time PCR에 의하여 RNA의 발현 분석을 실시하였다. 그 결과 SBE1, SBE3(BE II b), GBSS1, ISA1, PUL 등의 유전자에서 다른 isoforms 보다 RNA의 발현이 높았고 일부 유전자들은 등숙기 중에 단일 peak의 발현을 보였고 SBE3, GBSS1, SSS1, SSS2A(SS II A)와 같은 유전자들은 두 개의 peak를 보였다. 전분 생합성 과정에서 SBE1, GBSS1, SBE3, SSS2A, SSS1, SSS3A, ISA1, and PUL 등의 유전자들은 주된 역할을 하며 그 밖의 다른 효소들은 보조적인 역할을 하는 것으로 생각되었다.

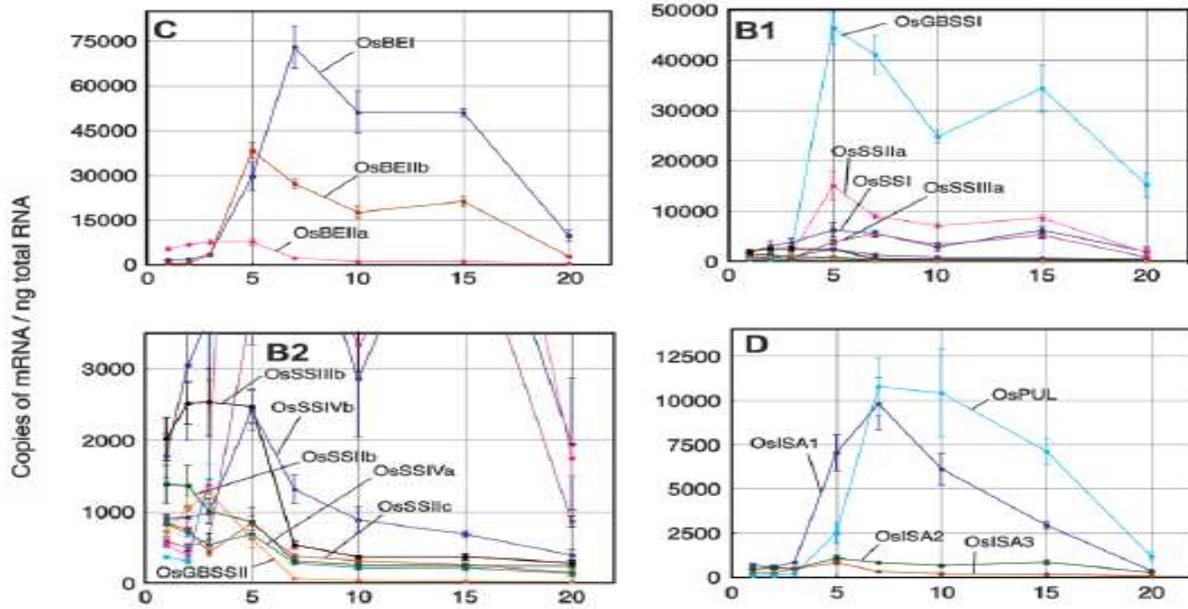


Fig. 3-6. Expression profiles of the 3 gene classes coding for starch-metabolizing enzymes during development of rice seeds. Rice spikelets were harvested at 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, and 20 d after flowering. An aliquot of the first strand cDNA mixture corresponding to 5 ng of total RNA was used as template for quantitative real-time RT-PCR. (Ohdan et al. 2005).

2. 전분가지화효소 유전자(OsSbe1)의 형질전환 발현에 의한 고식미 벼 계통 개발

가. 재료 및 방법

재조합 유전자 운반체 제작

벼 종자의 전분합성 대사의 마지막 부분에서 전분가지화효소 (starch synthase 1, Sbe1) 유전자의 발현량을 늘려서 아밀로펙틴 생합성량을 증대시키기 위하여 35S 프로모터에 Sbe1 유전자를 연결한 재조합 유전자를 **Figure3**과 같이 제작하였다. 식물 유전자 운반체인 pCAMBIA1300은 형질전환된 식물체의 선발을 위하여 hygromycin phosphotransferase (HPT)를 가지고 있는데, 그 부근에 있는 35S 프로모터에 연결된 multiple cloning site(MCS)에 Sbe1 유전자를 삽입하여 재조합 유전자를 제작하였다. 우선 Sbe1 (GenBank Accession No. AK068920) 유전자의 ORF를 얻기 위하여 유전자 특이적인 프라이머인 Sbe1-Fw(Xba1) 5'-TCTAGAATGGTGACTGTTGTGGAGGAG-3'와 Sbe1-Rv(Xba1), 5'-TCTAGATCATTGTCAGTCTTCGTCAGA-3'를 제작하였고 이를 이용하여 Nipponbare (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) 유래의 cDNA에서 RT-PCR 증폭에 의하여 Sbe1 유전자 ORF를 획득하였다. RT-PCR로 증폭된 Sbe1 ORF는 35S 프로모터에 연결된 multiple cloning site(MCS) XbaI site에 삽입하여 p35S:OsSbe1 재조합유전자를 제작하였다.

형질전환 및 재배 육성

재조합유전자 p35S:OsSbe1를 MicroPulser electroporation system (Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA)을 사용하여 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 도입한 다음 *Agrobacterium*-mediated 형질전환 방법을 이용하여 다음과 같이 유전자를 형질전환 하였다. 벼 종자를 이용하여 재조합유전자 p35S:OsSbe1를 형질전환하는 방법은 Melgar et al. (2009)에 기술하였듯이 Toki et al. (2006)의 방법을 수정하여 실험을 수행하였다. 유전자 형질전환에 사용한 배지의 조성은 **Table 3-4**와 같다.

우선 p35S:OsSbe1를 가진 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404를 50 mg/L kanamycin sulfate와 100 mg/L streptomycin가 포함되고 1.5% agar를 함유한 AB 고체배지에서 3일 동안 30°C 암 조건에서 배양하였다. 벼 종자의 배양은 일본형 고품질벼인 고품벼 종자의 건전한 종자만을 선발하여 종피를 제거한 다음 70% 에탄올로 2분 동안 멸균한 후 증류수로 1회 세척하였다. 그 다음 5% sodium hypochlorite 용액에서 15 분 동안 2회 소독한 후 증류수로 10회 이상 세척하였다. 소독한 종자는 1시간 동안 무균상태에서 충분히 건조한 뒤 2.5 mg/L 2,4-D와 0.4% gelrite가 포함된 N6D 배지에 치상하여 32°C에서 5일 동안 배양하였다. 앞서 AB 배지에 배양한 p35S:OsSbe1를 지닌 LBA4404를 30 mg/L acetosyringone이 포함된 20 ml AAM 액체배지에 현탁하여 OD650 값이 0.2가 되도록 농도를 조절하였다. 치상 후 약간의 캘러스가 유기된 종자를 LBA4404 현탁액 30 ml에 넣고 27°C에서 30분 동안 가볍게 거꾸로 흔들어 준 후 LBA4404 현탁액을 제거하고 멸균된 필터페이퍼(직경 9cm) 위에서 여분의 현탁액을 제거하였다. 균을 접종한 종자들을 0.4% gelrite를 함유한 1/2N6-AS 고체배지 위에 멸균된 필터페이퍼를 깔고 0.5 ml AAM-AS 액체배지로 적신 다음 그 위에 옮겨 28.5°C에서 1일, 23.5°C에서 4-5일 동안 암 조건에서 공동 배양하였다. 공동 배양한 후 종자를 500 mg/L carbenicillin이 포함된 증류수에서 10회, 2% plant preservative mixture(PPM, Plant Cell Technology, USA)가 포함된 증류수로 5회를 세척하여 잔여 *Agrobacterium*을 제거하였다. 세척이 끝난 종자를 신속히 멸균된 마른 필터페이퍼로 물기를 가볍게 제거하고 50 mg/L hygromycin과 400 mg/L carbenicillin이 포함된 N6D 고체배지에 치상하여 32°C에서 2주 동안 캘러스의 유기와 동시에 hygromycin에 의한 형질전환 캘러스의 선발과정을 수행하였다. 그 후 유기된 캘러스를 조심스럽게 종자로부터 분리하여 200 mg/L carbenicillin이 포함된 SF 배지로 옮겨 식물체의 재분화를 유도하였고 캘러스로부터 분화되어 성장한 식물체를 50 mg/L hygromycin이 포함된 RF 배지에 옮겨 뿌리를 유도하였다. 재분화 배지에서 줄기와 뿌리가 정상적으로 분화한 개체만을 선발하여, 2주 동안 배양실에서 순화시킨 후 개체별로 포트에 이식하여 인공환경조절 온실에서 재배한 뒤 종자를 수확하였다.

Sbe1 형질전환 벼 계통의 재배는 벼 유묘를 온실에서 육성하여 2008년, 2009년 6월 1일에 실험농장 벼 격리포장 포장에 이양하여 재배하였고 물 관리와 비료의 시용 및 병, 해충의 방제는 벼표준재배법에 준하여 수행하였다.

Table 3-4. All the culture media used in this experiment.

Composition	N6D(mg/l)	2N6-AS(mg/l)	AAM(mg/l)	SF(mg/l)	RF(mg/l)	AB(mg/l)
Macronutrient components						
KNO ₃	2.809	2.803		1.900	1.900	
NH ₄ Cl						1.000
NH ₄ NO ₃				1.650	1.650	
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	463				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	185	250	370	370	296
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166	166	150	440	440	10
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O			150			1,300
K ₂ HPO ₄						3,000
KH ₂ PO ₄	400	400		170	170	
KCl			3,000			150
Micronutrient components						
Na ₂ EDTA	37.3	37.3		37.3	37.3	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8		27.8	27.8	2.5
Fe-EDTA			40			
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.4	4.4	10 ^a	22.3	22.3	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	1.5	2.0	8.6	8.6	
CuSO ₄ ·5H ₂ O			0.025	0.025	0.025	
CoCl ₂ ·6H ₂ O			0.025	0.025	0.025	
KI	0.8	0.8	0.75	0.83	0.83	
H ₃ BO ₃	1.6	1.6	3.0	6.2	6.2	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O			0.25	0.25	0.25	
Organic components						
Casamino acid	300	300	500	2,000		
Glycine	2.0	2.0	7.5	2.0	2.0	
L-Arginine			176.7			
L-Proline	2,878					
L-Glutamine			900			
L-Aspartic acid			300			
<i>myo</i> -Inositol	100	100	100	100	100	
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5	
Pyridoxine HCl	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5	
Thiamine HCl	0.1	0.1	10	0.1	0.1	
Phytohormones						
2,4-D ^b	2.5	2.5				
NAA ^c				1.0		
Kinetin ^d				5.0		
Acetosyringone ^e		10~20	10~20			
Carbon source						
Sucrose	30,000	30,000	68,500	30,000	30,000	
Sorbitol				30,000		
Glucose		10,000	36,000			5,000
pH	5.8	5.2	5.2	5.8	5.8	7.2

aMnSO₄·4-6H₂O

b2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

c1-Naphthylacetic acid

d6-Furfurylaminopurine

e3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone

DNA 추출 및 도입 유전자 확인

벼 재배 포장에 재배 중인 벼 식물체로부터 분얼기에 소량의 잎을 채취하여 DNA를 추출하였다(Cho et al. 2009). 벼 잎 1g을 14 ml tube에 넣고, 액화질소를 이용하여 곱게 마쇄한 후 DNA 추출 용액 (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM EDTA, Sodium bisulfate 0.38g/100 ml) 1 ml를 첨가하여 유봉으로 잘 혼합한 후, chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 1 ml를 첨가하여 10분간 흔들어 잘 혼합한 다음 3,500 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 분리한 후 동일 양의 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1)를 첨가하여 10회 정도 흔들어 준 후, 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 1.5 ml tube에 옮긴 다음 2 μ l의 RNase(10mg/l)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 2/3~1 volume의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 응축시킨 다음 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시킨 후, 70% 에탄올로 세척하고, 12,000 rpm으로 5분간 다시 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 DNA를 풍건시킨 다음 70 μ l의 TE에 DNA를 녹여서 PCR 분석에 사용하였다. 추출한 DNA를 10~50배로 희석한 다음 시료당 20 ng을 취하여 PCR 분석에 이용하였다.

PCR에 사용한 primer는 Sbe1 앞에 위치한 35S 프로모터 단편의 특이적인 DNA 증폭을 위하여 forward primer (5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3')와 reverse primer (5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3')를 합성하여 사용하였다. HPT 유전자(GenBank Accession No. V01499.1)는 HPT forward (5'-GGATTTCGGCTCCAACAATGTCCTGA -3')와 HPT reverse (5'-CTTCTACACAGCCATCGGTCCAGA-3') 프라이머를 사용하여 유전자의 도입 여부를 분석하였고 Sbe1 유전자는 35S 프로모터부터 Sbe1 유전자 부위를 35S-Fw:CGCACAATCCCCTATCCTT와 Glb-Rv.Sbe1:GAAATTGGTCTTGACCTTTC CA 2개의 primer를 사용하여 증폭하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 hot step, 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 35 cycle 반응시킨 후, 72°C에서 5분간 마지막 extension의 프로그램으로 PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research Inc., CA, USA)를 사용하여 증폭하였으며 1% agarose gel 상에서 유전자의 도입 여부를 확인하였다.

아밀로스 함량 조사

현미에서의 아밀로스 함량의 분석은 Juliano (1971)의 방법을 약간 변형한 방법을 사용하여 조사하였다. 10 mg의 미세하게 분쇄한 현미가루를 20 ml 튜브에 넣고 100 μ l의 100% 에탄올을 첨가하고 잘 혼합한 다음 900 μ l의 1N NaOH를 첨가하고 잘 혼합하여 현미가루가 잘 풀리며 섞이게 하였다. 그 다음에 100°C의 수조에서 30분 동안 가운을 하여 전분이 완전히 호화 되도록 하였고 튜브를 식히고 vortex mixer로 혼합하여 10 ml까지 증류수로 채웠다. 500 μ l의 sample을 취하여 5 ml의 증류수를 넣은 새로운 20 ml 튜브에 넣고 100 μ l의 1N acetic acid로 중화하였다. 여기에 200 μ l의 새롭게 만든 iodine-potassium iodide solution (2g KI+100 ml distilled water + 0.2g I₂)와 4.2 ml의 증류수를 첨가하고 vortex mixer로 잘 혼합하여 30°C에

서 30분 동안 암 조건에서 반응을 시킨 후 분광흡광도계(HP 845x UV-visible system)의 620 nm에서 흡광도를 조사하였다.

아밀로스 함량의 표준곡선은 감자 유래의 1 mg/ml 표준 아밀로스 용액(Cat. No: A0512-5G, Sigma-Aldrich)과 1 mg/ml 표준 아밀로펙틴 용액(Cat.No: 10118, Sigma-Aldrich)을 사용하여 설정하였다. 아밀로스 함량 시리즈를 (0%) 18 ml 표준 아밀로펙틴 용액 + 2 ml 0.09 mol/L NaOH, (5%) 1ml 표준 아밀로스 용액 + 17 ml 표준 아밀로펙틴 용액 + 2 ml 0.09 mol/L NaOH, (10%) 2ml 표준 아밀로스 용액 + 16 ml 표준 아밀로펙틴 용액 + 2 ml 0.09 mol/L NaOH, (15%) 3ml 표준 아밀로스 용액 + 15 ml 표준 아밀로펙틴 용액 + 2 ml 0.09 mol/L NaOH, (20%) 4ml 표준 아밀로스 용액 + 14 ml 표준 아밀로펙틴 용액 + 2 ml 0.09 mol/L NaOH, (25%) 5ml 표준 아밀로스 용액 + 13 ml 표준 아밀로펙틴 용액 + 2 ml 0.09 mol/L NaOH 로 제조하였다. 무 전분 용액은 500 µl의 호화된 전분시료 대신에 500 µl 0.09 mol/L NaOH만으로 만들었고 이 무 전분 용액과 앞의 아밀로스 함량 시리즈 전분표준용액은 다른 분석 대상 시료와 동일하게 분석과정을 처리하였다. 아밀로스 함량의 대조 품종으로서는 아밀로스 함량 18%의 고품벼(형질전환 모품종)를 사용하였고 각 시료는 3반복을 취하여 분석을 수행하였다.

Semi-quantitative RT-PCR 및 quantitative real-time RT-PCR 분석

실험농장의 벼 포장에 재배 중인 T2 형질전환 벼의 등숙기에 RT-PCR 분석을 위한 벼 미숙 종자의 시료를 초형이 균질화된 형질전환 벼 계통 중에서 채취하였다. 우선 T1 종자의 아밀로스 함량에 따라 저 아밀로스함량 계통(10-14%), 중 아밀로스함량 계통(18-19%), 고 아밀로스함량 계통(>25%)으로 벼의 초형이 우수한 계통들 중에서 sampling 할 대상 계통을 선정하고 T2 형질전환 벼의 출수기에 각 계통의 출수일을 정하고 출수일로부터 각각 10일과 15일된 이삭을 채취하여 즉시 액화질소로 냉동하여 -80℃에 사용 전까지 보관하였다.

벼 미숙종자로부터 총 RNA의 분리는 RNeasy mini kit(Qiagen)의 회사에서 제공하는 실험 방법을 약간 수정하여 수행하였다. 90 mg의 곱게 분쇄한 동결분말을 1.5 ml 튜브에 넣고 600 µl RLC buffer를 가하여 즉시 vortex로 강하게 섞어준 다음 지체 없이 13,000 rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 상층액을 lilac spin column으로 용액이 굳지 않도록 신속히 옮기고 12,000 rpm에서 2분 동안 다시 원심분리하였다. 원심분리 후에 column을 통하여 분리한 추출물을 정제하기 위하여 100% 에탄올 280 µl 를 가하고 4-5회 피펫으로 혼합한 다음 pink RNeasy spin column으로 옮겨 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 다시 pink RNeasy spin column에 700 µl의 RW1 buffer를 가하고 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 그 다음 RNA의 세척을 위하여 500 µl의 RPE buffer를 가하고 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하는 과정을 2회 반복하고 여분의 RPE buffer를 완전히 제거하기 위하여 10,000 rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. RNA의 회수를 위하여 50 µl 의 RNase-free water를 pink spin column에 가한 다음 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. RNA의 농도는 Nanodrop

ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc. USA)를 사용하여 정확한 농도를 측정하였으며, 즉시 -80℃에 보관하였다.

RT-PCR을 수행하기 위하여 cDNA의 합성은 다음과 같이 수행하였다. 총 RNA는 DNase 1 kit (Cat. No: 18068-015, invitrogen)를 사용하여 정제를 하였고, first-strand cDNA의 합성은 Oligo(dT)20 primer와 SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Cat. No:18080-051, Invitrogen)를 사용하여 mRNA를 cDNA로 합성하였다.

RT-PCR에 사용한 primer를 conserve region으로부터 제작하기 위하여 Sbe1 유전자의 protein sequence를 NCBI/BLAST website에서 blast 분석을 수행하여 14 species의 protein sequence를 획득하였고 이들을 가지고 clustalw(DDBJ/CLUSTALW website) 분석 수행하여 Sbe1 유전자의 conserved domain을 찾을 수 있었고 그로부터 RT-PCR을 위한 primer들을 Primer3 online software(http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)를 이용하여 고안하였고 Oligo 6 software에서 검토하였다. 제작한 RT-PCR primer는 다음과 같이 Sbe1-Fw (5'-CTACCATCAACCGTGGCATT-3')와 Sbe1-Rv(5'-GTCGACAAGGCTCCACTGAC-3') 이었고 사용한 cDNA의 균일 함량을 체크하기 위한 내부 마커로서 Actin-1 유전자(GenBank Accession No. AK071586.1)를 사용하였는데, 그 primer들은 ACT1-Fw (5'-ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA-3')와 ACT1-Rv (5'-ATCCAACCGGAGGATAGCA TG-3') 였다.

Semi-quantitative RT-PCR first-strand cDNA 50ng, 5 pmol Sbe1-Fw/Rv primers와 0.5 unit Takara Ex-Taq(Takara Bio Inc.)을 20 µl PCR 반응액에 혼합하여 94℃에서 4 분 동안 반응 후에 94℃에서 30 초, 55℃에서 30 초, 72℃에서 30 초의 과정을 28회 반복하고 마지막 7 2℃에서 5분 동안 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% 아가로즈겔에서 분리하여 분석 하였다.

Sbe1 효소 활성 분석

벼 종자에서 Sbe1, Sbe3 및 Sbe4 동위효소들의 효소활성 분석은 여러 보고에서 사용한 방법(Nakamura et al. 1989; Yamanouchi and Nakamura 1992; Li et al. 1997; Zhao et al. 2005; Zhao et al. 2007)을 종합하고 변형하여 수행하였다.

동결 보존되어 있던 벼 종자 1g을 취하여 종피와 배를 제거하고 배유만을 분리하여 미리 차갑게 한 유발에 넣고 4 ml의 차가운 추출 buffer (50mM HEPES-NaOH pH 7.4, 4mM MgCl₂, 50mM 2-mercaptoethanol, 12.5%(v/v) glycerol)를 가하여 유봉을 사용하여 얼음 위에서 곱게 마쇄하였다. 마쇄한 배유를 미리 차갑게 한 40 ml 튜브에 넣고 6 ml의 추출 buffer를 사용하여 2회 유발을 세척하여 40 ml 튜브에 넣고 15,000 rpm, 2℃에서 20 분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 Whatman filter(0.45µm, Whatman, LTD)를 통하여 수집한 다음 그 용액을 효소활성의 측정에 사용하였다.

Sbe 효소의 활성은 토끼 근육 phosphorylase에 의하여 glucose-1-P를 α-glucan 합성을 촉매하는 반응과정을 분석 측정하였다 (Hawker et al. 1974; Nakamura et al. 1989). 앞에서 준비한 400 μl의 효소 추출액을 400 μl의 차가운 반응 buffer (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 50 mM glucose-1-P, 2.5 mM AMP, 4.8 units phosphorylase)에 넣고 혼합한 다음 30°C에서 30 분 동안 반응시켰다. 효소의 반응은 50 μl 1M HCl과 1 ml dimethylsulfoxide, 1.5 ml fresh iodine-potassium iodide 용액(2g KI+ 200 ml distilled water + 0.2g I₂)을 넣고 혼합하여 30°C에서 60 분 동안 암 조건에서 반응시켜 반응을 중지하였다. Sbe 효소의 활성은 분광흡광도계 (HP 845x UV-visible system)의 540 nm에서 흡광도를 조사하여 분석하였다. 분석에 사용한 표준용액은 다음과 같이 준비하였다. 400 μl의 효소 추출액을 50 μl 1M HCl과 잘 혼합하고 400 μl의 차가운 반응 buffer를 가하여 혼합하였으며 다른 과정은 앞의 시료와 동일하게 처리하였고, 무처리 용액은 400 μl의 효소 추출액 대신에 400 μl의 차가운 반응액 만을 첨가하였고 다른 과정은 시료와 동일하게 처리하였다. Sbe1 효소활성의 계산은 다음과 같이 하였다. Sbe1 효소활성(%)=((시료 OD₅₄₀-표준액 OD₅₄₀)/표준액 OD₅₄₀)×100로 하여 계산하였는데, OD₅₄₀에서 흡광도 1% 수준에서의 증가를 Sbe1 효소활성(Units/g/min)의 1 unit으로 정의하였다. 또한, 모든 시료는 3반복으로 하여 분석을 수행하였다.

농업형질과 수량 및 수량구성요소

Sbe1 형질전환 벼 513 개 T2 계통을 온실에서 육묘하여 2009년 6월 1일에 실험농장 벼 포장에 이양하여 재배하였고 물 관리와 비료의 시용 및 병, 해충의 방제는 벼표준재배법에 준하여 수행하였다.

형질전환 벼 513 개 T2 계통 중에서 소형이 우수하고 균일한 193 개 계통에 대하여 출수기, 초장, 간장, 수장, 수수와 수량 및 수량구성요소 등을 8월부터 10월에 걸쳐 조사하였다. 조사방법은 농촌진흥청 표준조사방법에 준하여 조사하였다.

식미도 및 관련 형질 조사

벼 종실을 91% 백미로 도정을 하여 식미도 및 관련 성분의 분석에 이용하였다 (Peng et al. 2006; Lestari et al. 2009). 식미도의 검정은 TOYO 식미계 (Toyo taste meter, model MA-90)를 사용하여 제조회사의 분석방법(Toyo Rice Polishing Machine Factory, Japan)에 따라 분석하였다. 단백질 함량은 micro-Kjeldahl 방법(AOAC 1995)을 사용하였고 측정된 값을 질소계수 5.95를 곱하여 환산하였다. 백미의 아밀로스 함량은 100-mesh 쌀가루 호화용액의 starch-iodine 색도의 비교흡광도를 측정하여 구하였다 (Perez and Juliano, 1978). 알칼리붕괴도(ADV)는 Little et al. (1958)의 알칼리붕괴도 실험법과 spreading score방법에 따라 수행하였다. RVA pasting properties은 Rapid Visco Analyzer(RVA)를 사용하여 제조회사의 분석방법(NewPort Sci. Co., Australia)에 따라 분석하였다. 벼의 전분 paste profile은 다음과 같은 6가지 요소들에 대하여 조사하였다; Peak viscosity (PV), hot paste viscosity (HPV), cool paste viscosity (CPV), breakdown viscosity (BDV=PV-HPV), setback viscosity (SBV= CPV-PV), consistency viscosity (CTV=CPV-HPV) (Bao and Xia, 1999; Shen et al., 2006) 및 호화온도. 모든 viscosity

parameters는 Rapid Visco Units(RVU)으로 나타내었다.

통계적 분석

실험에서 얻어진 자료들은 Microsoft Excel 2007과 Statistix software version 8.0을 활용하여 분석하였다. 주요 농업형질들과 식미도 및 식미 관련 요소들에 대한 빈도 분포도의 작성은 Microsoft Excel 2007을 사용하여 수행하였고, 식미 관련 요소들간의 상관관계 분석은 Statistix software version 8.0을 사용하여 수행하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 재조합 유전자 운반체 제작

전분대사 과정에서 **Figure 3-7**에 나타난 바와 같이 amylose와 amylopectin 합성에 관련된 주요 효소인 Sbe1, SSS, GBSS, SUS, AGPase 등 유전자를 클로닝하여 이들 유전자를 과발현 및 RNAi 방법을 이용하여 유전자의 발현을 조절함으로써 다양한 아밀로스와 아밀로펙틴 함량이 발현되는 벼 계통을 육성하며 이들 중에서 양식미의 특성을 나타내는 고품질미 계통을 선발하고자 하는 실험의 일환으로 연구를 수행하였다.

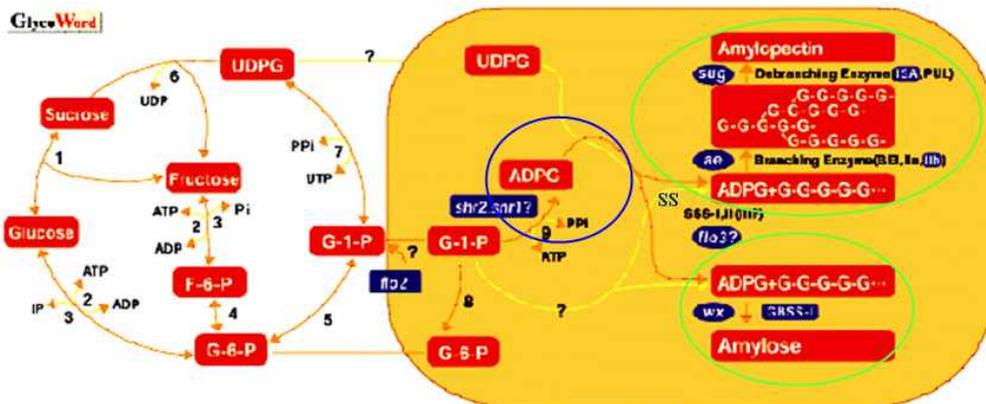


Fig. 3-7. Schematic process of starch metabolism that shows the active functional location of enzymes in relation to the synthesis of amylose and amylopectin.

벼 종자의 전분합성 대사의 마지막 부분에서 전분가지화효소 (starch synthase 1, Sbe1) 유전자의 발현량을 늘려서 아밀로펙틴 생합성량을 증대시키기 위하여 35S 프로모터에 Sbe1 유전자를 연결한 재조합 유전자를 제작하였다. 식물 유전자 운반체인 pCAMBIA1300은 형질전환된 식물체의 선발을 위하여 hygromycin phosphotransferase (HPT)를 가지고 있는데, 그 부근에 있는 35S 프로모터에 연결된 multiple cloning site(MCS)에 Sbe1 유전자를 삽입하여 재조합 유전자를 제작하였다. 우선 Sbe1 (GenBank Accession No. AK068920) 유전자의 ORF를 얻기 위하여 유전자 특이적인 프라이머인 Sbe1-Fw (Xba1) 5'-TCTAGAATGGTGACTGTTGTGGAGG AG-3'와 Sbe1-Rv (Xba1), 5'-TCTAGATCATTTGCAGTCTTCGTCAGA-3'를 제작하였고 이를 이용하여 Nipponbare(*Oryza sativa* L. ssp. *janopica*) 유래의 cDNA에서 RT-PCR 증폭에 의하여

Sbe1 유전자 ORF를 획득하였는데, ORF 염기서열은 2,268 bp이었고 아미노산 서열은 755 개의 아미노산으로 구성되어 있었다(Figure 3-8). RT-PCR로 증폭된 Sbe1 ORF는 35S 프로모터에 연결된 multiple cloning site(MCS) XbaI 좌에 삽입하여 p35S:OsSbe1 재조합유전자를 제작하였다(Figure 3-9).

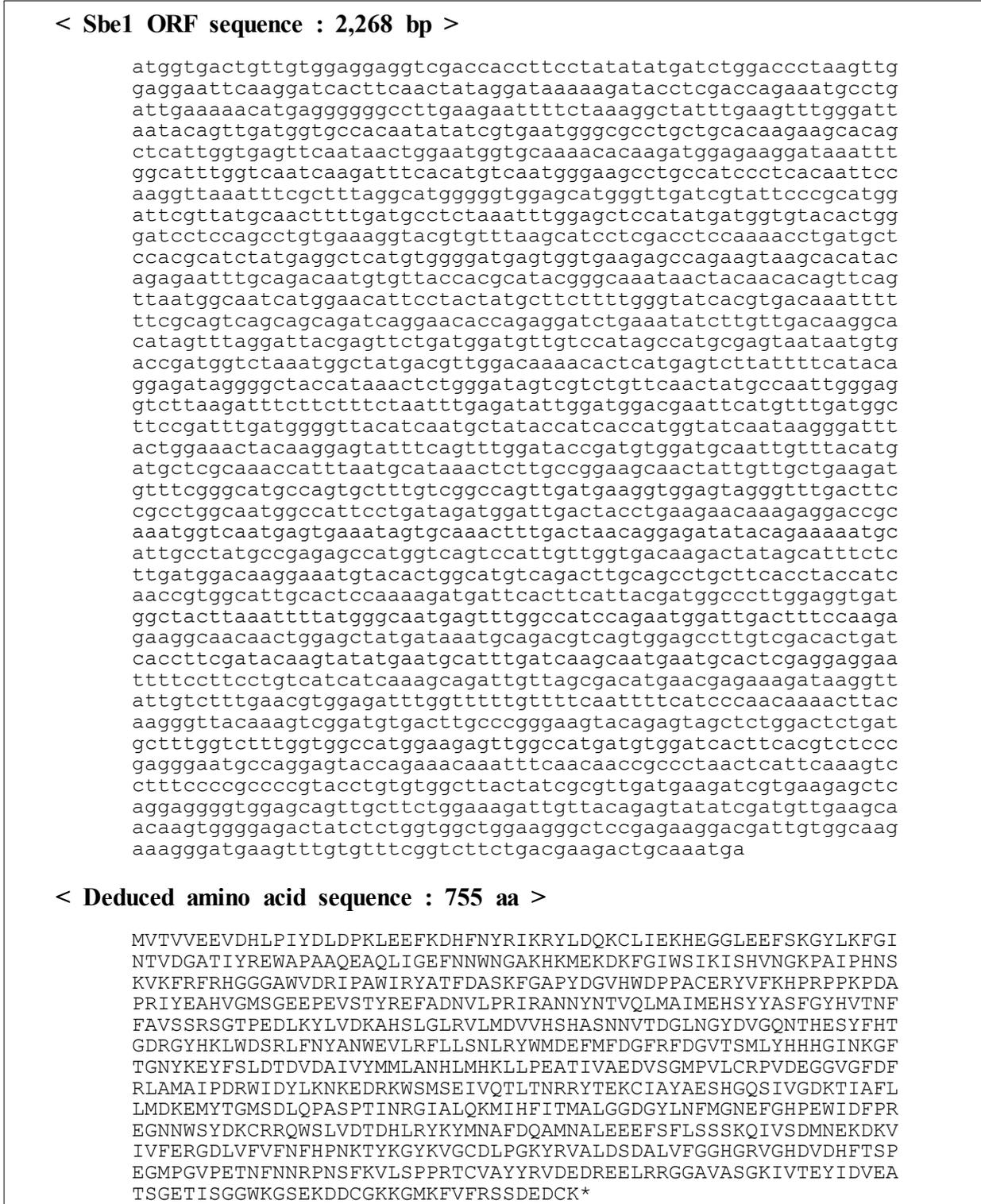


Fig. 3-8. Nucleotide sequences of rice starch branching enzyme1 gene obtained by RT-PCR and their deduced amino acid sequence.

35S::*Sbe1* vector

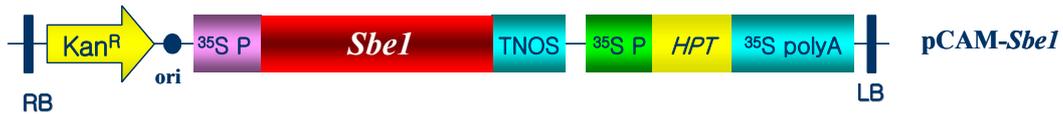


Fig. 3-9. Vector construction of p35S:OsSbe1 that would expect to increase the expression of starch branching enzyme in starch metabolism of rice.

(2) *Sbe1* 재조합 유전자의 형질전환 벼 분석 및 후대육성

벼 전분가지화효소 (*Sbe1*)를 35S 프로모터에 *Sbe1* 유전자를 연결하고 선발마커로 HPT 유전자를 결합하여 제작한 p35S:OsSbe1 재조합 유전자는 *Agrobacterium* 방법을 이용한 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 **Figure 3-10**와 같이 형질전환 하였다. 식물체 분화배지에서 재분화된 어린 벼는 조직배양실에서 2주 동안의 순화과정을 거친 다음 온실의 포트에 이식하여 재배하여 종자를 수확하였다. 벼 식물체에 유전자 도입여부 HPT 유전자와 35S promoter 3'-end와 *Sbe1* 유전자의 5'-end에서 제작한 primer를 이용하여 PCR로 분석한 결과 **Figure 3-11**와 같이 1,065개 벼 재분화 개체 중에서 1,005개 개체에서 *Sbe1* 유전자의 도입이 확인되었다. 또한, p35S:OsSbe1 재조합체에 의한 벼 형질전환 재분화체의 호모화 개체를 선발하여 후대육성을 위하여 수확한 종자를 **Figure 3-12**과 같이 hygromycin 50 mg/L가 첨가된 배지에서 발아검정을 하여 발아된 종자를 온실에서 육묘하여 포장에 이양하여 후대를 육성하였다.

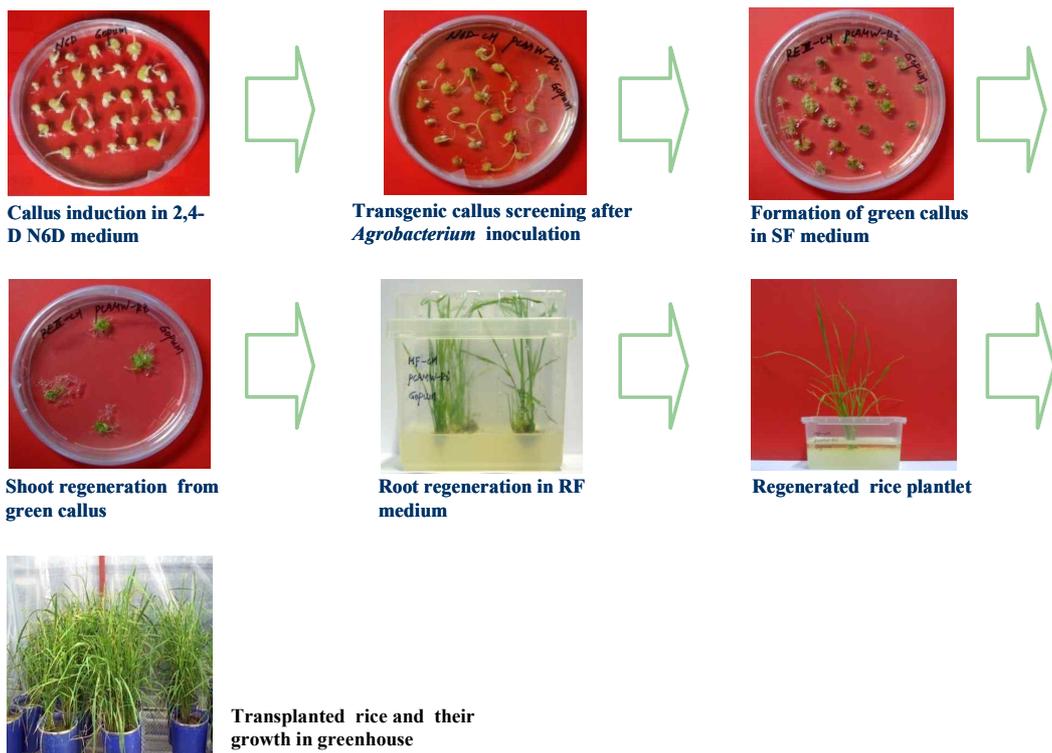
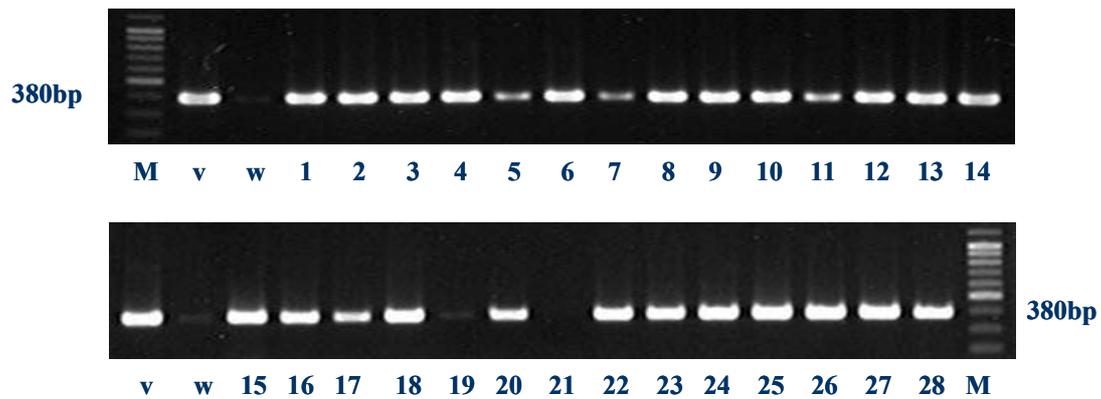


Fig. 3-10. Callus induction and regeneration of rice embryogenic calli after transformation of *Sbe1* gene.

(A) HPT



(B) Sbe1

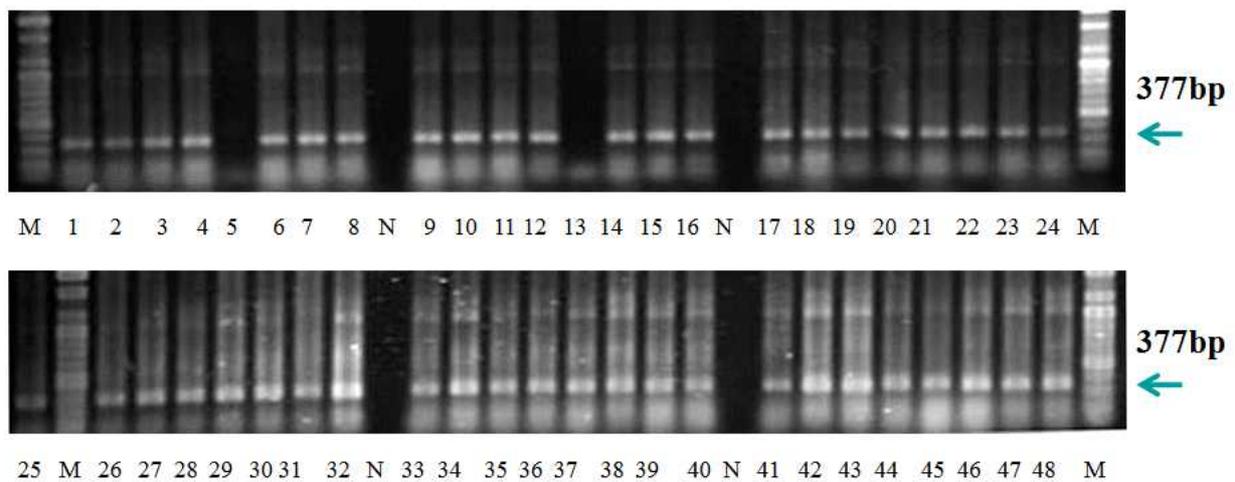


Fig. 3-11. Analysis of hygromycin phosphotransferase(HPT) gene and starch branching enzyme 1(Sbe1) gene in transgenic rice plants introduced with 35S::Sbe1 recombinant vector by Agrobacterium-mediated method. 1,065 transgenic rice plants in T1 generation were analyzed using HPT-Fw/HPT-Rv(A) and 35S-F1/Sbe1-Rv1(B) primer pairs. 1,005 transgenic rice plants from line 11903 to 12012 were shown (A) the introgression of HPT gene except two plants, 19 and 21, and (B) the introgression of Sbe1 ORF except two plants, 5 and 13. M: 100 bp ladder DNA, V: positive control vector, W: wild type, N: negative control.

35S::Sbe1 형질전환체의 육성, 호모계통 선발 및 농업형질 조사



Fig. 3-12. Breeding of transgenic rice plants in greenhouse and screen of T1 seeds in the medium with 50 ppm hygromycin to select homo plants among the transgenic rice plants transformed with 35S::Sbe1 vector construct.

(3) RT-PCR에 의한 Sbe1 유전자의 발현분석

재조합 Sbe1 유전자의 형질전환을 통하여 벼에 도입한 Sbe1 유전자의 발현을 RNA 전사체의 발현수준에서 검토하기 위하여 semi-quantitative RT-PCR로 분석한 결과 **Figure 3-13**에 나타난 바와 같이 wild type인 고품벼는 아주 약한 발현을 보인데 비하여 Sbe1 유전자가 도입된 계통들은 모두 고품벼 보다 높은 RNA의 발현을 보였는데 계통에 따라서 발현에 큰 차이를 나타내었다. 한편, 이들 벼 형질전환 계통을 포장에 이양하여 재배하였을 때의 변이계통들의 표현형도 **Figure 3-14**에 나타난 바와 같이 형질전환 과정에서 다양한 변이의 발생으로 큰 변이를 나타내었다.

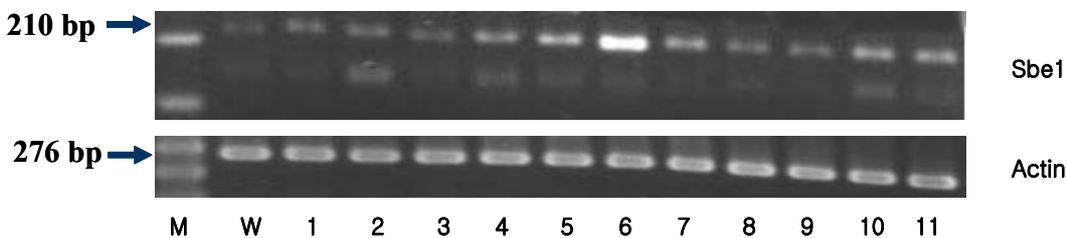


Fig. 3-13. The semi-quantitative RT-PCR of Sbe1 gene for wild type and transgenic rice plants. 80 ng of synthesized cDNA and actin gene as the control were used for semi-quantitative RT-PCR. W, wild type; 1-5, transgenic plants with favorable phenotypes, 6-11, transgenic plants with abnormal phenotypes.

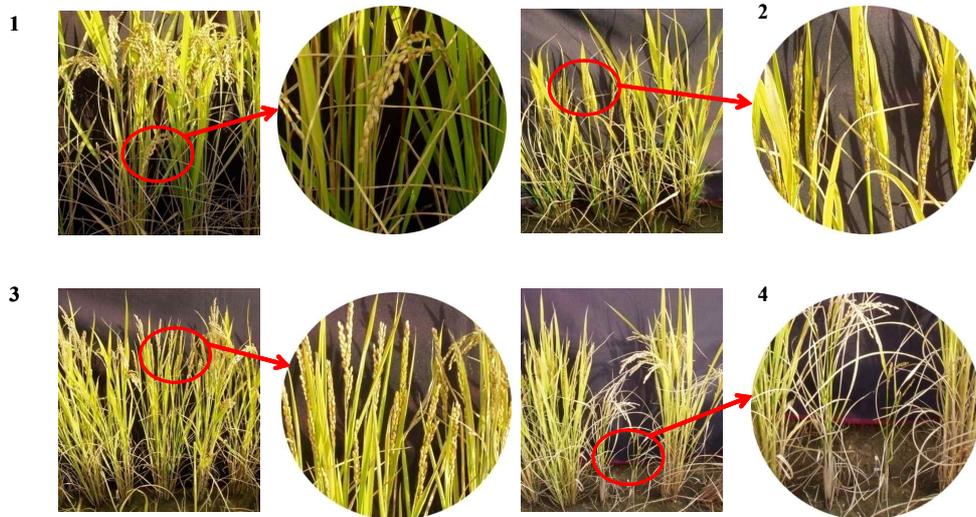


Figure 3-14. The mutants of transgenic rice harboring Sbe1 ORF. 1, purple stem mutation; 2, long awn spikelets; 3, erect panicle mutation; 4, dwarf and only few tillers mutation compare to wild type Gopumbeyo.

(4) Sbe1 유전자 도입 T2 세대 형질전환체의 amylose 함량 분석

벼의 starch branching enzyme 1 효소 유전자를 35S promoter를 이용하여 과발현시켜 육성한 벼 형질전환체 903개 T2 계통에서 종실의 아밀로스 함량(AAC)을 조사한 결과는 **Figure 3-15**에 나타낸 바와 같다. Sbe1 유전자가 도입된 형질전환 벼 종실의 아밀로스 함량은 커다란 변이를 보였는데 12~29% 범위의 다양한 변이를 나타내었다. 특히, 고품질미 벼의 육성에 적합하리라 예상하는 15~17% 범위에 가장 많은 빈도를 나타내어 예상했던 다양한 아밀로스 함량 변이체의 육성이 가능 할 것으로 생각되었다. 그러나, 22~25% 범위의 높은 아밀로스 함량을 나타낸 계통들에서는 gene silencing이 일어난 결과로 아밀로스 함량이 높아졌을 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

Sbe1 유전자가 도입된 903개 T2 형질전환 벼 계통에서 아밀로스 함량별 계통수를 보면 **Table 3-5**에 나타낸 바와 같이 17~17.5% 범위에 가장 많은 90개 계통들이 속하였고 식미도가 우수한 아밀로스 함량 범위인 15.5~19.0% 범위에 속하는 계통들이 513 계통이 되어 Sbe1 유전자의 도입에 의하여 전분가지화 효소의 과발현으로 전분 중에 아밀로스의 함량이 감소된 것으로 생각 된다.

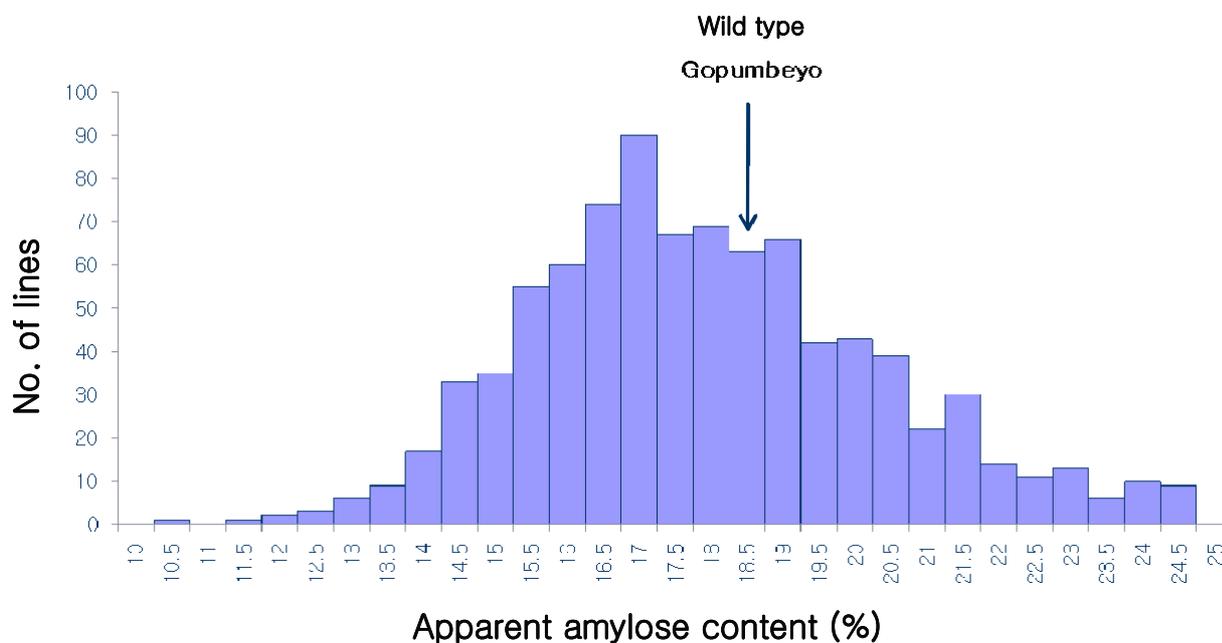


Fig. 3-15. Distribution of apparent amylose content (AAC) in brown rice for 903 T2 transgenic lines.

Table 3-5. Apparent amylose content (AAC) variation in brown rice starch from 903 T2 transgenic rice lines.

Amylose content(%)	Typical line	No. of lines	Amylose content(%)	Typical line	No. of lines
10.5-11	12006-15	1	18-18.5	11919-13	69
11.5-12	11962-13	1	18.5-19	11918-9	63
12-12.5	11954-8	2	19-19.5	11921-13	66
12.5-13	11905-12	3	19.5-20	11925-18	42
13-13.5	11916-14	6	20-20.5	11911-18	43
13.5-14	11916-1	9	20.5-21	11917-8	39
14-14.5	11915-17	17	21-21.5	11912-14	22
14.5-15	11905-3	33	21.5-22	11920-3	30
15-15.5	11905-15	35	22-22.5	11916-10	14
15.5-16	11917-2	55	22.5-23	11909-11	11
16-16.5	11925-13	60	23-23.5	11917-4	13
16.5-17	11919-12	74	23.5-24	11917-14	6
17-17.5	11921-4	90	24-24.5	11917-17	10
17.5-18	11912-12	67	24.5-25	11985-7	9

(5) Sbe1 유전자 형질전환체의 amylose 함량의 세대별 변이

형질전환 벼의 T2 세대에서 아밀로스 함량을 분석하였을 때 **Figure 3-15** 및 **Table 3-5**에 나타난 바와 같이 벼 종실의 아밀로스 함량은 커다란 변이를 보여 12~25% 범위의 다양한 변이를 나타내었는데, 그 계통들 중에서 T2 세대에서 아밀로스 함량이 low(12%), medium (18%), high(28%)를 보였던 계통들을 선택하여 T3 세대에서 RT-PCR에 의하여 RNA 발현을 분석한 결과 **Figure 3-16**과 같이 wild type 고품벼에 비하여 6개 계통에서 RNA 함량이 높게 발현되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이들 계통에 대하여 종실의 아밀로스 함량을 분석한 결과 **Table 3-6**에 나타난 바와 같이 12% 정도로 낮았던 계통들은 15% 정도로 높아졌고 28% 정도로 높았던 계통들은 17% 정도로 낮아졌으나 18% 정도였던 계통들은 거의 비슷한 수준을 유지하여 형질전환 벼의 세대가 진전되면서 벼에 도입된 Sbe1 유전자의 세포내 안정화와 더불어 전분가지화 효소의 발현이 전사 후 단계에서 조절이 되어 아밀로스 함량의 조절이 이루어진 것으로 생각된다.

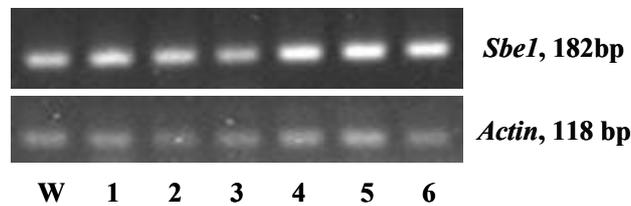


Fig. 3-16. The semi-quantitative RT-PCR analysis with immature seeds as sampled at 15 days after flowering in T3 generation that showed different apparent amylose contents in T2 generation. 50 ng of the first strand cDNA was used as template, and the Sbe1 primers were designed from the conserved domains of Sbe1, and 28 cycles were adopted for Sbe1 and Actin. Code W, and 1-6 represent the lines in Table 4.

Table 3-6. Several T3 lines developed from different apparent amylose content T2 generation.

Lines	Gopum	13017	13282	13218	13145	11985-11	12010-8
T3	18%	14.96%	15.76%	17.75%	16.16%	16.92%	no data
T2	18%	12.57%	12.32%	18.35%	18.04%	28.48%	29.62%
Code*	W	1	2	3	4	5	6

* Code in RT-PCR

(6) 벼 계통의 전분가지화 효소 활성

벼에서 전분가지화 효소 Sbe1과 Sbe3의 활성을 고품질벼들과 저품질벼들에서의 발현양상을 RNA 수준에서 개화기부터 5일 간격으로 개화 후 25일까지 미숙종자를 채취하여 분석한 결과 **Figure 3-17**에 제시한 바와 같이 전분가지화 효소의 발현은 개화 후 10~15일에 가장 높은 발현을 보였는데, 고품질벼들과 저품질벼들 간에 발현시기가 상이한 것으로 나타났다. Sbe1과

Sbe3 모두에서 고품질벼인 고품벼와 일품벼는 개화 후 10~20일에 가장 높은 발현을 보였으나 저품질벼인 팔공벼에서는 고품질벼들에 비하여 전분가지화 효소의 발현이 훨씬 낮았고 발현시기도 후기까지 이어지는 양상을 보였고 삼남벼에서는 발현량은 고품벼들과 비슷하였으나 발현시기가 5일 정도 빠른 개화 후 5~15일 사이에 많은 발현을 나타내었다. 이러한 현상은 고품벼들의 경우에는 배유에 전분의 축적이 가장 왕성한 개화 후 10~20일에 가장 높은 발현이 집중됨으로써 전분의 가지화에 Sbe1과 Sbe3 효소들이 효율적으로 이용되어 아밀로펙틴의 함량을 증가시키고 아밀로스의 함량을 저하시키는 한편 전분이 축적될 때에 물리성을 향상시켜 식미도를 증가시키는 것으로 추정된다.

따라서, 형질전환 벼에서도 Sbe1과 Sbe3 발현이 가장 높은 시기인 개화 후 15일에 미숙종자 시료를 채취하여 전분가지화 효소의 활성을 측정하였다. 형질전환 벼의 T2 세대에서 아밀로스 함량을 분석하였을 때 아밀로스 함량이 low(12%), medium (18%), high(28%)를 보였던 계통들을 각각 2계통씩 선택하여 T3 세대에서 출수 후 15일에 미숙종자를 채취하여 wild type인 고품벼와 함께 전분가지화 효소의 활성을 분석한 결과는 **Figure 3-18** 및 **Table 3-7**에 나타낸 바와 같다.

전분가지화 효소의 활성 측정에는 Sbe1, Sbe3 및 Sbe4 3종의 전분가지화에 관련된 효소의 활성이 모두 포함된 효소 활성으로 측정하였는데, T2 세대에서 전분함량이 낮은 12.57%였던 (**Table 3-6**) 13017 계통에서 가장 높은 전분가지화 효소의 활성으로 wild type인 고품벼 보다 5.6배의 높은 효소 활성을 보였고 그 다음으로 12.32%였던 13282 계통에서 높아 고품벼 보다 1.9배의 높은 효소 활성을 나타내었고, 고품벼와 유사한 아밀로스 함량을 보였던 13218 (18.35%)과 13145(18.04%)에서는 wild type인 고품벼와 유사한 효소 활성을 나타내었으나, T2 세대에서 아밀로스 함량이 높았던 11985-11 (28.48%)과 12101-8 (29.62%) 계통은 wild type인 고품벼 보다 효소 활성이 각각 0.52배와 0.32배로 현저히 낮았다. Sbe1 유전자의 형질전환 벼 중에서 이와 같이 전분가지화 효소의 활성이 현저히 낮았던 것은 도입된 Sbe1 유전자의 발현에서 RNA 간섭에 의하여 gene silencing이 일어난 것으로부터 기인한 것으로 생각되었다.

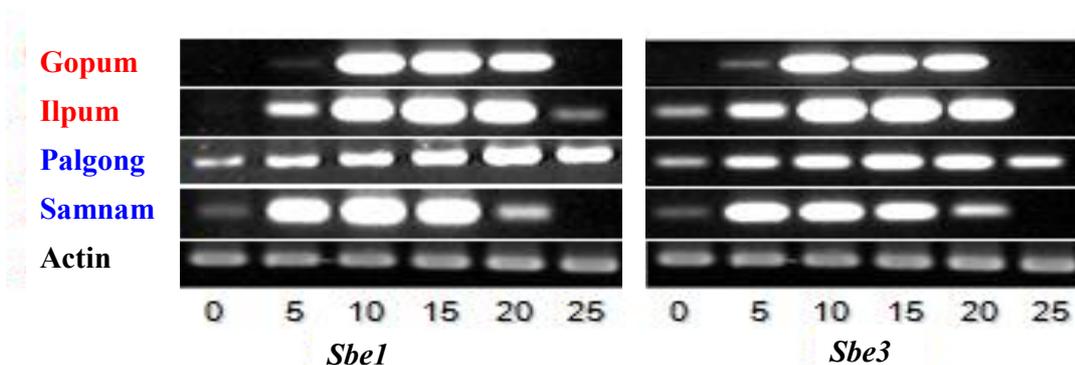


Fig. 3-17. Expression profiles of Sbe1 and Sbe3 during rice seed development. Rice panicles were harvested at 0, 5, 10, 15, 20, and 25 days after flowering. 100 ng of first strand cDNA was used as template.

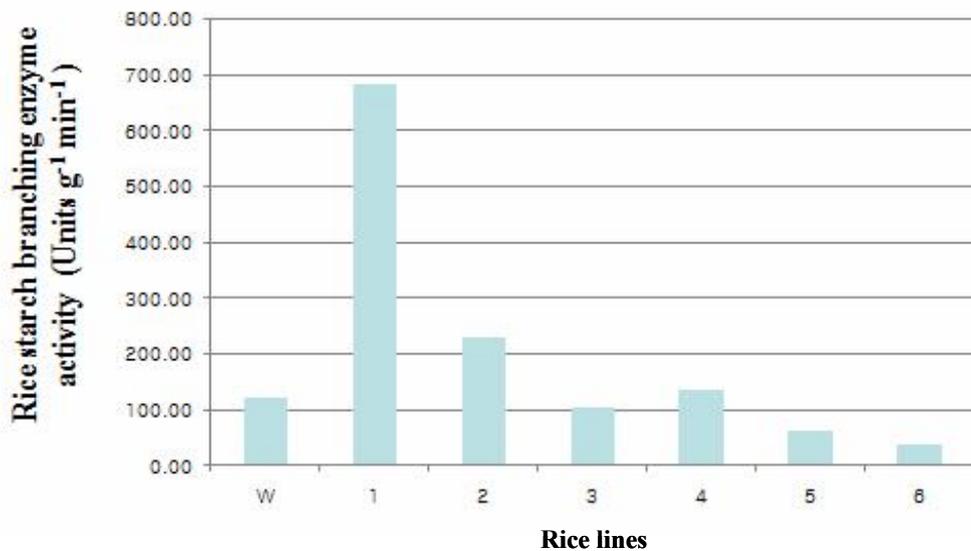


Fig. 3-18. Enzyme activities of rice starch branching enzymes including Sbe1, Sbe3, and Sbe4 in rice immature seeds from wild type Gopum and T3 lines with low, medium, and high apparent amylose content in T2 lines as sampled at 15 days after flowering. Code W, and 1-6 represent the lines in Table 6. The low Sbe enzyme activity leads to high amylose content.

Table 3-7. Apparent amylose content, enzyme activities, and eating quality in six T3 transgenic lines developed from T2 lines with low, medium and high amylose contents.

Lines	Gopum	13017	13282	13218	13145	11985-11	12010-8
T3 apparent amylose content	18%	14.96%	15.76%	17.75%	16.16%	16.92%	-
T2 apparent amylose content	18%	12.57%	12.32%	18.35%	18.04%	28.48%	29.62%
Sbe enzyme activity (Units g ⁻¹ min ⁻¹)	121.65	684.53	230.37	105.91	135.76	63.51	38.82
Toyo taste meter value	70.4	65.9	71.2	65.3	69.5	-	-

형질전환 벼의 T2 세대에서 아밀로스 함량을 분석하였을 때 아밀로스 함량이 low(12%), medium (18%), high(28%)를 보였던 계통들을 각각 2계통씩 선택하여 T3 세대에서 출수 후 15 일에 미숙종자를 채취하여 wild type인 고품벼와 함께 전분가지화 효소의 활성을 분석하고 수확 종자를 가지고 아밀로스 함량과 Toyo 식미치를 분석하여 비교한 결과는 Table 3-7에 나타난 바와 같다.

T2 세대에서 아밀로스 함량이 low(12%)와 medium (18%)이었던 계통들에서는 T3 세대에서도 T2 세대와 유사한 아밀로스 함량의 경향을 나타내었으나 high(28%)이었던 계통들에서는 오히려 감소하였다. 아밀로스 함량이 Low(12%)이었던 계통들에서 약 2.5% 정도의 아밀로스 함량의 증가를 보였고 medium (18%)이었던 계통들에서는 비슷하거나 약간의 감소를 보였는데, 전체적으로 전분가지화 효소의 활성과 비교하여 검토해 보면 전분가지화 효소의 활성이 높은 계

통들에서 아밀로스 함량이 저하되는 경향을 보였는데, T2 세대에서 아밀로스 함량이 많이 낮아서 RNA 간섭에 의한 post-transcriptional gene silencing이 일어났을 것으로 예상되는 11985-11(28.48%)과 12101-8(29.62%) 계통은 전분가지화 효소의 활성이 저하되었는데도 T3 세대에서 아밀로스 함량이 16.96%의 낮은 값을 나타내어 좀 더 자세한 검토가 필요한 것으로 생각되었다. 한편, 6개 형질전환 벼 계통의 식미 정도를 검토하기 위하여 Toyo Taste Meter를 이용하여 측정된 식미치를 비교해 보면 전분가지화 효소 활성이 고품벼 보다 1.9배가 높고 아밀로스 함량이 낮은 13282 계통은 식미치가 71.2로서 wild type 고품벼의 70.4 보다 높은 값을 나타내었으며, medium인 13145 계통이 69.5로서 고품벼와 유사한 값을 보였으나 13017과 130218은 각각 65.1과 65.3으로서 고품벼 보다 다소 낮았는데 특히, 전분가지화 효소 활성이 가장 높았던 13017 계통이 식미치가 낮은 경향을 보여 자세한 검토가 필요한 것으로 생각된다.

(7) 형질전환 벼 계통의 주요 작물학적 특성

형질전환 벼의 T3 세대에서 1차 선발한 193개 계통에 대하여 초장, 간장, 수장, 수수 등을 조사하여 wild type인 고품벼와 비교한 결과는 Table 3-8 및 Figure 3-19과 같다.

초장은 형질전환 벼 계통들은 83.7~113.5 cm의 분포를 보였는데 Figure 3-19에 나타난 바와 같이 100 cm 를 중심으로 정규분포를 이루었는데 전체적으로 wild type인 고품벼의 평균 112.2 cm에 비하여 작은 분포를 보였다. 간장은 형질전환 벼 계통들은 56.5~81.3 cm의 분포를 보였는데 고품벼의 간장과 같은 71 cm 를 중심으로 정규분포를 이루었다. 수장도 형질전환 벼 계통들은 18.6~26.6 cm의 분포를 보였는데 고품벼의 수장과 같은 22 cm 를 중심으로 정규분포를 이루었다. 수수도 형질전환 벼 계통들은 8~16 개의 분포를 보였는데 고품벼의 수수과 같은 11 개를 중심으로 정규분포를 이루었다. 52개의 T3 계통만을 선발하여 분석한 Toyo Taste meter 식미치는 고품벼가 70.4의 값을 나타내었는데 Figure 3-20에서 볼 수 있듯이 형질전환벼에서는 61.1~72.6의 값을 보여 평균이 67.6으로서 고품벼 보다 낮았으나 70.4의 고품벼의 식미치 보다 높은 계통이 8개, 비슷한 계통이 5개 계통이 선발되었다.

Table 3-8. Agronomic traits and Toyo taste meter value of wild type and 193 T2 lines (Toyo taste test is done for 52 T3 lines).

Traits	Wild type	T2 lines				
		Mean	SD	Range of variation	CV(%)	Max/Min
Plant height(cm)	112.2	100.1	4.15	83.7-113.5	4.15	1.36
Culm length(cm)	71.4	71.0	4.70	56.5-81.3	6.62	1.44
Panicle length(cm)	22.7	22.0	1.26	18.6-26.6	5.73	1.43
Panicles per plant	11	11	1.47	8-16	13.29	8
Toyo taste meter value	70.4	67.6	2.93	61.1-72.6	4.33	1.19

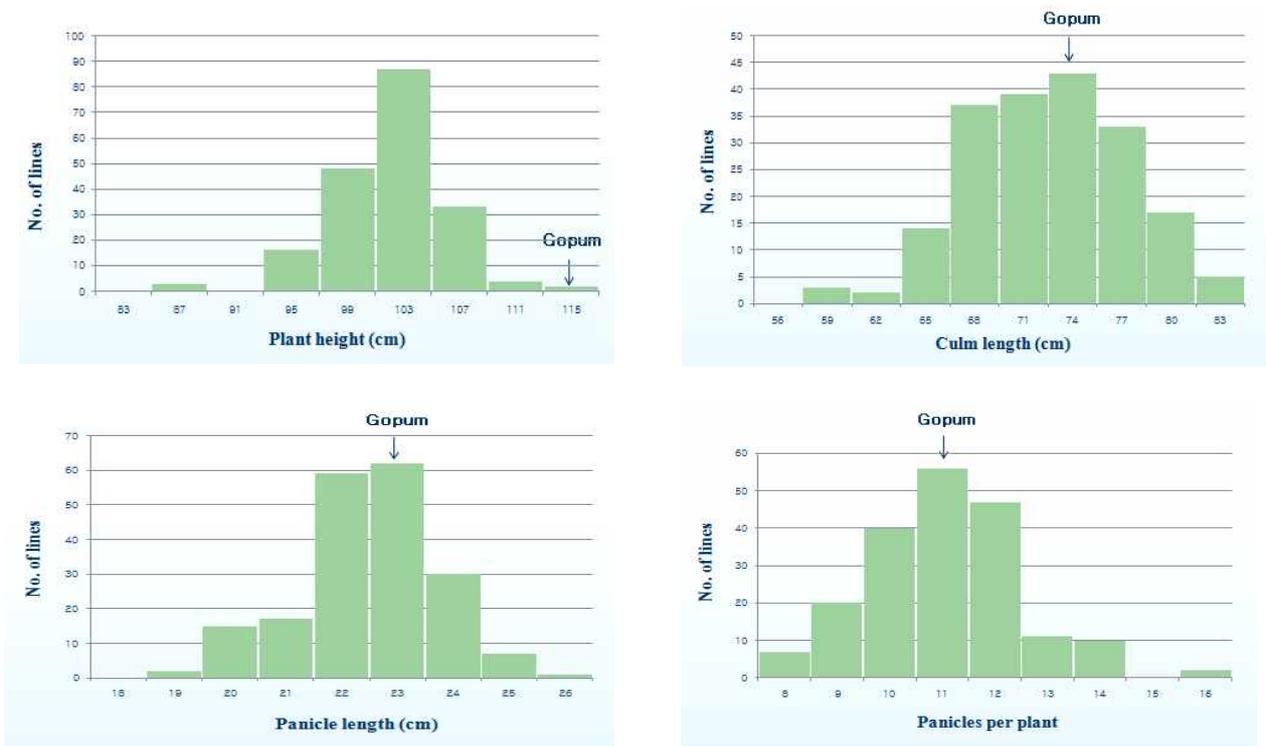


Fig. 3-19. Distribution of plant height, culm length, panicle length, and panicles per plant in 193 T2 lines derived from Gopum transformed by Sbel.

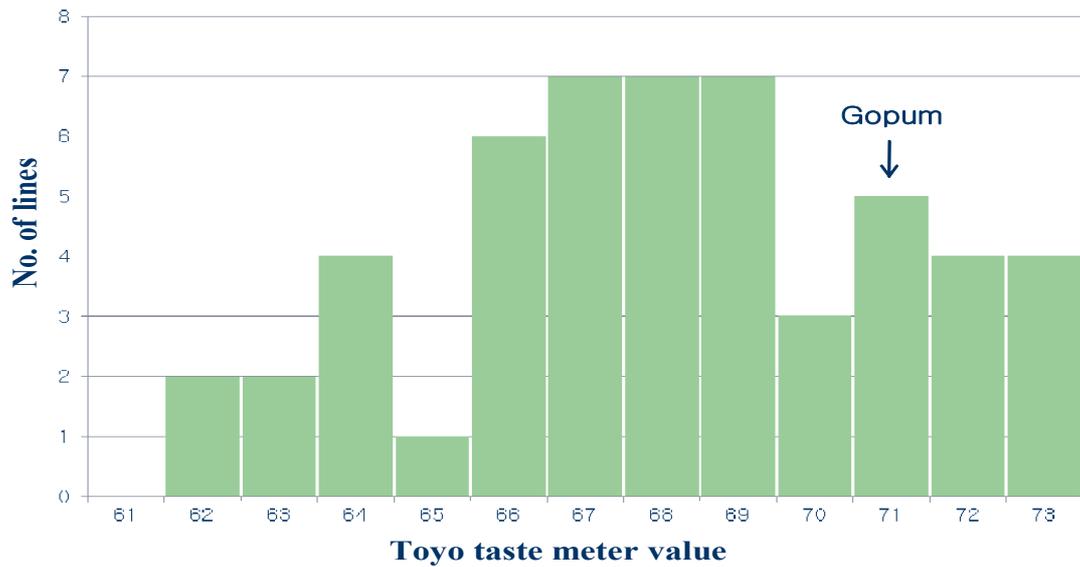


Fig. 3-20. Distribution of Toyo taste meter value in rice grains of 52 T3 lines derived from Gopum transformed by Sbel

(8) 형질전환 벼 계통의 주요 품질 특성

고품벼에 Sbe1 유전자를 도입한 형질전환 벼의 T2 세대에서 palatability와 관련된 여러 가지 요소들을 백미를 가지고 분석한 결과 **Table 3-9**과 **Figure 3-21**에서 보인 바와 같이 쌀의 물리화학적 특성에 많은 변화가 발생한 것으로 나타났다. 특히 호화점성(peaking viscosity), 치반 점도(setback), 강하점도(breakdown)과 같은 호화특성(pasting property)의 변화가 컸으며, 아밀로스 함량과 단백질 함량에서도 큰 차이를 나타내었다. 밥맛을 평가하는 기준으로 많이 고려하는 식미도 (palatability)의 경우에도 많은 변이를 보였는데 Toyo Taste meter 식미치는 고품벼가 70.4의 값을 나타내었는데 형질전환벼에서는 61.1~72.6의 값을 보여 평균이 67.6으로서 고품벼 보다 낮았으나 70.4의 고품벼의 식미치 보다 높은 계통이 8개, 비슷한 계통이 5개 계통이 선발되었다.

Table 3-9. Palatability quality parameters in polished rice of wild type and 52 T3 lines.

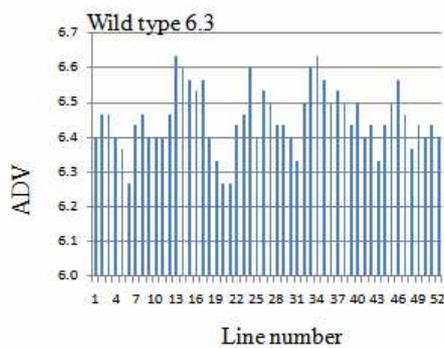
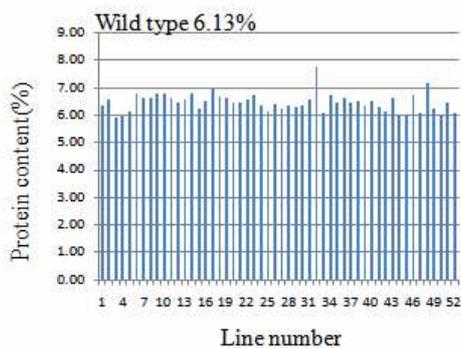
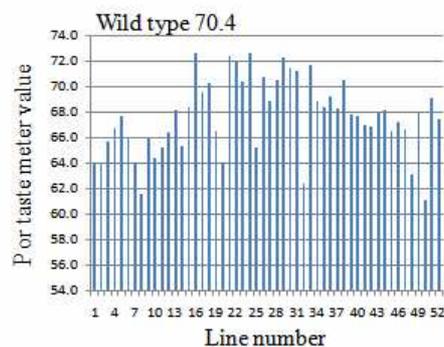
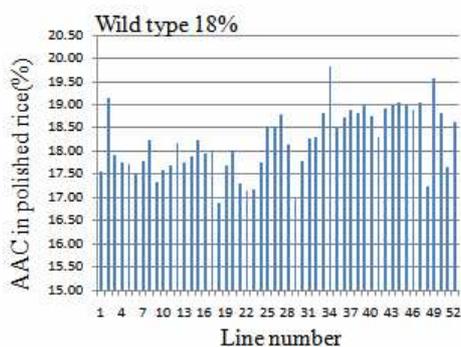
Parameters	Wild type	T3 lines					
		Mean	SD	Range	CV(%)	Skew	Kurtosis
P*	70.4	67.6	2.93	61.1-72.6	4.33	-0.17	-0.58
AAC(%)	18.00	18.21	0.69	16.87-19.81	3.77	0.09	-0.74
PC(%)	6.13	6.47	0.33	5.91-7.80	5.12	1.17	3.43
ADV	6.3	6.5	0.09	6.3-6.6	1.42	0.17	-0.81
PV(RVU)	276.07	251.66	42.90	142.01-325.37	17.05	-0.88	-0.17
HPV(RVU)	163.45	125.83	36.87	29.85-163.74	29.30	-1.26	-0.02
CPV(RVU)	269.90	234.90	40.28	124.43-281.80	17.15	-1.23	0.11
BDV(RVU)	112.62	125.84	15.64	94.24-170.35	12.43	0.34	0.02
SBV(RVU)	-6.17	-16.76	15.12	-59.96- 22.46	90.21	-0.30	0.44
CTV(RVU)	106.44	109.08	8.36	94.58-127.09	7.67	0.53	-0.65
PT(°C)	68.08	68.11	0.04	68.05-68.2	0.05	0.36	-0.57

* P(Toyo meter value), AAC(apparent amylose content), PC(protein content), ADV(alkali digestion value), PV(peaking value), HPV(hot paste viscosity), CPV(cool paste viscosity), BDV(breakdown value), SBV(setback viscosity), CTV(consistency viscosity), PT(pasting temperatue).

식미도와 관련이 있는 요소들간의 상관관계를 살펴보면 **Table 3-10**과 **Figure 3-21**에 나타낸 바와 같이 쌀알의 아밀로스 함량은 식미도에 관여하는 많은 요소들과 상관관계를 보였는데 응집점도(CTV, consistency viscosity), 최종점도(CPV, cool paste viscosity), HPV(hot paste viscosity), SBV(setback viscosity) 등과는 높은 정의 상관을 나타냈고 ADV(alkali digestion value), PV(peaking value)와도 정의상관을 보였으나 단백질과는 부의 상관을 나타내었다. 그러나, 백미에서 특정 범위의 아밀로스 함량이나 단백질 함량과 식미도(palatability) 간에는 정의 상관이 없는 것으로 나타나서 아밀로스 함량이나 단백질 함량을 적절히 조절을 하여 식미도에 관여하는 여러 가지 요소들의 적절한 조합을 찾는다면 현재 보다 식미도가 우수한 고품질의 벼를 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3-10. Correlation coefficients among the palatability quality parameters in polished rice of 52 T3 lines.

Parameter	AAC	ADV	BDV	CPV	CTV	HPV	P	PC	PT	PV
ADV	0.29*									
BDV	-0.19	-0.15								
CPV	0.49**	0.09	0.26							
CTV	0.42**	0.39**	0.33*	0.49**						
HPV	0.44**	0.01	0.21	0.98**	0.31*					
P	-0.10	0.13	-0.15	-0.25	0.19	-0.32*				
PC	-0.28*	0.07	-0.16	-0.18	0.05	-0.21	-0.19			
PT	0.05	-0.02	0.12	0.17	-0.10	0.21	-0.13	-0.26		
PV	0.31*	-0.05	0.54**	0.94**	0.39**	0.93**	-0.33*	-0.24	0.22	
SBV	0.43**	0.37**	-0.85**	0.01	0.21	-0.04	0.26	0.20	-0.18	-0.34*



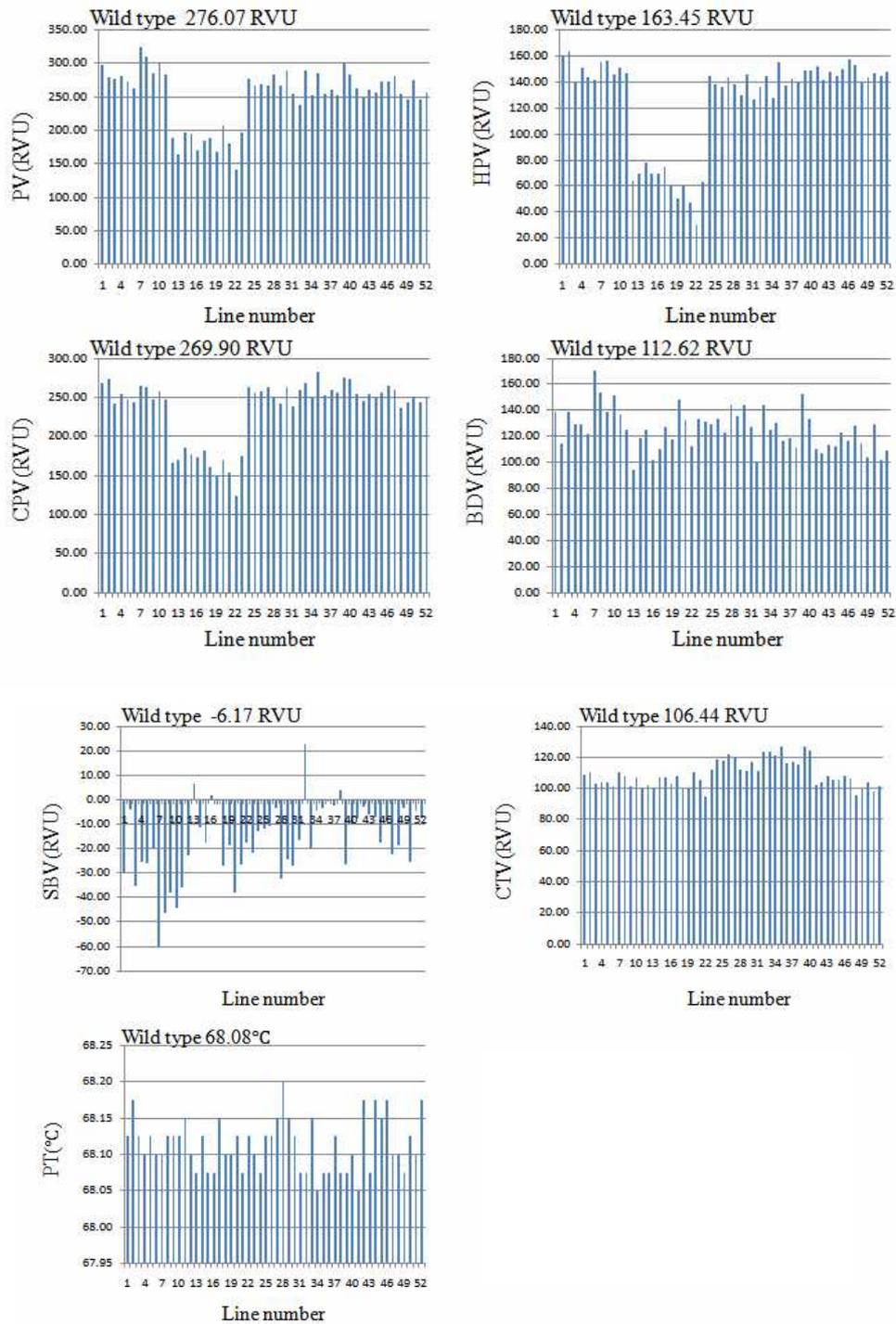


Fig. 3-21. Distribution of AAC(apparent amylose content), P(Toyo meter value), protein content, ADV(alkali digestion value), PV(peaking value), HPV(hot paste viscosity), CPV(cool paste viscosity), BDV(breakdown value), SBV(setback viscosity), CTV(consistency viscosity), PT(pasting temperatue) in polished rice of 52 T3 lines.

(9) 우수 형질전환 벼 계통의 선발 및 주요 특성

T2 세대의 형질전환 벼를 포장에 재배하였을 때에 초형과 수량성이 우수한 농업적 특성을 나타내는 계통을 **Figure 3-22**과 같이 선발하여 그들에 대하여 각종 형질을 조사한 결과는 **Table 3-11**과 같다.

Figure 3-22에서 볼 수 있듯이 Sbe1 유전자의 형질전환 벼 계통 중에서 모품종인 고품벼와 비교하여 초형, 병충해에 대한 건전성, 이삭 특성 등을 고려하여 선발한 계통들 중의 일부에 대한 형질 조사 결과를 보면 Table 3-11에 나타난 바와 같이 초장, 간장, 수장, 수수, 등숙률, 천립중 등에서 모품종의 변이폭 내에 분포할 정도의 작물학적 특성을 나타냈으며, 특히 수량에서 보면 모품종인 고품벼의 602.7 kg/10a에 비하여 높은 607.9~722.7 kg/10a의 현미 수량성을 나타내었다.

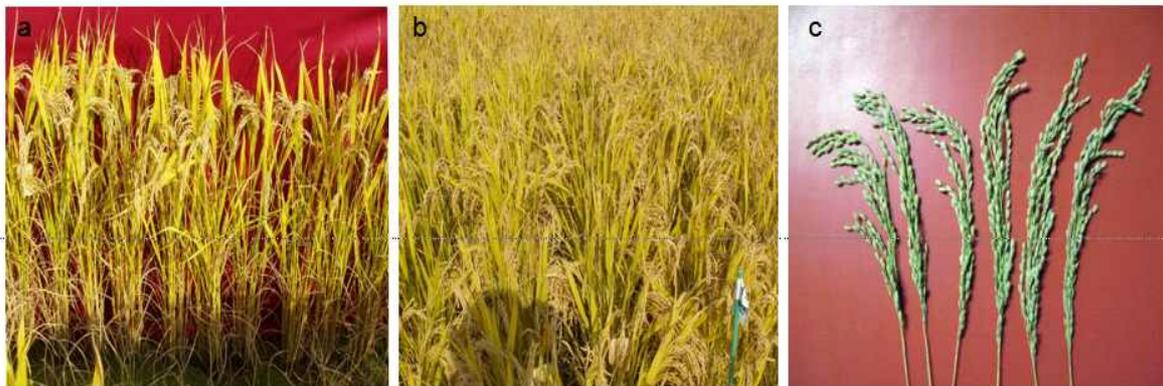


Fig. 3-22. Selection of transgenic lines with favorable phenotype in T2 generation.

a: 13347 line; b: 13341-13352 lines, c: panicle comparison, the first three panicles are from Gopum, and the other three panicles are from 13347 line.

Table 3-11. The yield components of wild type, Gopumbyeo and eight T2 lines with favorable phenotype selected as elite lines.

Lines	Plant height (cm)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Plants /10a	Panicles /plant	Spikelets/p anicle	Ripened grain ratio (%)	1000 brown rice grain weight (g)	Yield/10a (kg)
Gopum	101.6	70.2	22.8	22684	11	119	91.8	22.11	602.7
13341	109.1	76.6	23.6	22684	12	128	92.8	22.35	722.7
13343	103.0	72.8	22.1	22684	12	127	94.5	21.80	712.2
13344	104.3	75.1	22.2	22684	12	136	88.6	21.45	703.6
13345	107.4	76.1	22.3	22684	12	121	93.1	22.69	695.8
13347	105.8	77.5	21.5	22684	11	124	91.3	21.52	607.9
13348	106.0	75.7	22.4	22684	11	141	87.6	22.92	706.4
13349	104.4	71.8	21.7	22684	11	146	92.2	20.85	700.3
13352	102.5	81.3	21.4	22684	12	134	92.9	21.09	714.7

(10) 고식미 형질전환 벼 계통의 선발 및 주요 특성

T2 세대의 형질전환 벼를 포장에 재배하였을 때에 초형과 수량성이 우수한 농업적 특성을 나타내면서 T2 종자에서 아밀로스 함량이 낮았던 계통을 중심으로 선발하여 T3 종자를 수확하여 아밀로스 함량, 작물학적 특성, 수량성, 식미도 등을 조사한 결과는 **Table 3-12**와 같다.

초형이 우수하면서 아밀로스 함량이 12.32~17.45%로 고품벼 보다 낮았던 9개 계통을 선발하여 작물학적 특성을 살펴보면 출수기는 고품벼의 8월 16일과 비슷한 8월 14일~16일 정도였고 초장은 고품벼의 112.2 cm 보다 작은 97.6~105.3 cm 로 도복을 고려하면 유리한 조건으로 작아졌고 간장은 고품벼는 71.4 cm 인데 선발 계통들은 66.5~77.5 cm 범위에 분포하였으며 수장은 고품벼는 22.7 cm 이고 선발 계통들은 19.3~23.7 cm 범위에 분포하였고 수수는 고품벼는 11개인데 선발 계통들은 10~13개 범위에 분포하였다. 수량성을 살펴보면 고품벼가 현미 수량에 있어서 602.7 kg/10a 인데 비하여 선발한 엘리트 계통들은 607.9~719.0 kg/10a의 높은 수량성을 나타내어 wild type인 고품벼 보다 높은 수량성을 나타내었으며, 식미도에 있어서도 고품벼가 Toyo taste value가 70.4인데 비하여 모든 선발 계통에서 70.5~72.6으로서 고품벼와 같거나 높은 우수한 식미성을 나타내어 앞으로 새로운 품종으로 개발할 수 있는 높은 가능성을 나타내었다.

Table 3-12. Selection of nine elite transgenic lines developed with high palatability quality and good phenotype.

2009 T2 lines	AAC in T2 seed (%)	Phenotype evaluation	Flowering date	Plant height (cm)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Panicles /plant	Yield/10a (Kg)	Toyo taste of T3 seeds
Gopum	18%	good	8.16.	112.2	71.4	22.7	11	602.7	70.4
13144	16.78	A	8.16.	100.4	68.4	19.3	12	719.0	72.5
13182	14.93	E	8.15.	102.4	72.1	22.9	11	678.6	71.9
13211	17.45	A	8.16.	98.9	66.8	21.1	11	689.5	72.6
13234	16.45	A	8.16.	103.1	71.2	23.7	10	697.9	70.7
13255	17.02	E	8.16.	100.1	70.0	23.1	10	654.1	70.5
13262	16.66	A	8.17.	98.9	66.5	22.6	10	701.1	71.5
13282	12.32	A	8.14.	97.6	69.5	21.6	13	735.9	71.2
13297	15.30	E	8.15.	103.4	75.8	21.2	12	716.4	71.7
13347	16.49	E	8.14.	105.3	77.5	21.5	12	607.9	70.5

Note: E, excellent; A, grade A.

3. 전분합성 관련 유전자의 형질전환 벼 개발

가. 재료 및 방법

과발현 및 RNA inference 운반체 제작

유전자 과발현을 위해 cauliflower mosaic virus(CaMV) 35S promoter에 의해 조절되고 bar (bialaphos resistance) 유전자가 포함된 Sbe1, AGL2, SUS1 유전자를 삽입하여 식물 형질전환

용 벡터를 구축하였다. Globulin promoter는 pMGR, pMGA, pMGS 내에서 조직 특이적 유전자의 발현을 위해 사용되었다. Globulin promoter를 증폭하기 위해 유전자 특이적인 Glb-Fw(Cla1) 5'-TATTATATCGATGGCGCCTGGAGGGAGGAG-3' 와 Glb-Rv(BamHI) 5'-GCGAGGAGGATCCGATGATGATCAATCAGAC-3' 를 제작하였고 이를 이용하여 자포니카 벼 품종인 Nipponbare DNA 유래의 globulin promoter를 획득하였다. 증폭된 globulin promoter 단편을 pMJ21의 Cla1, BamHI site에 삽입하였다.

OsSbe1 (GenBank Accession No. EF122470) 유전자의 ORF를 얻기 위하여 유전자 특이적인 프라이머인 SOsSbe1-Fw(Xba1) 5'-GCTCTAGAATGCTGTGTCTCACCTCC-3'와 OsSbe1-Rv(Xba1) 5'-GCTCTAGAGCTCATTTGCAGTCTTCGTC-3'를 제작하였고 이를 이용하여 KCS318A05(GenBank Accession No. EF122470) 유래의 cDNA에서 RT-PCR 증폭에 의하여 OsSbe1 유전자 ORF를 획득하였다. 증폭된 OsSbe1 ORF는 pMG plasmid (pMG21plus globulin promoter)의 XbaI site에 삽입하였고 pMGR plasmid를 구축하였다. pBluescript II SK-plasmid (GenBank Accession No. AK071497)내에 있는AGPL2 ORF 는 우선 intermediate plasmid pCR2.1-TOPO의 BamHI, XhoI site에 subcloning 하였고 pMG의 BamHI, XbaI site에 삽입되었다. pBluescript II SK- plasmid (GenBankAccession No. EF122480)내에 있는 SUS1 ORF는 우선 intermediate plasmid pCR2.1-TOPO의 BamHI, XhoI site에 subcloning 하였고 pMG의 BamHI, XbaI site에 삽입되어 pMGS를 형성하였다.

RNA inference 운반체인 pCAMW-Ri와 pCAMS-Ri은 형질전환된 식물체의 선발을 위하여 cauliflower mosaic virus(CaMV) 35S promoter에 의해 조절되는 hygromycin phosphotransferase (HPT)를 가지고 있으며 35S promoter는 pCAMW-Ri와 pCAMS-Ri내에 유전자 발현을 유도한다. Gus (GenBank Accession No. AJ298139) 유전자 증폭을 위해 유전자 특이적인 Gus-Fw(Cla1) 5'-CCATCGATGTGTACGTATCACC-3' 와 Gus-Rv, 5'-GAACGGTTTG TGGTTAATCAGG-3' 프라이머를 이용하였고 linker(intron)로서 사용되었다. 증폭된 단편을 pCR2.1-TOPO TA cloning plasmid(Invitrogen)에 클로닝하여 pCG를 구축하였다.

Waxy (GenBank Accession No. AK070431) 유전자의 증폭을 위해 유전자 특이적인 SWaxy-Fw(Kpn1) 5'-GGGGTACCTCATGGTGATCTCTCCTC-3'와 Waxy-Rv (Cla1) 5'-CCATCGATGGCCTTCATCCAGTTGATC-3' 및 Waxy-Fw (Xba1) 5'-GCTCTAGAGCTCATGGTGATCTCTCCTC-3' 와 Waxy-Rv (EcoR1) 5'-GGAATTCGGCCTTCATCCAGTTGATC-3' 프라이머를 제작하였고 이를 pCG plasmid에 각각 삽입하여 pCGW 와 pCGW-Ri 운반체를 구축하였다. CaMV 35S promoter 와 the nopaline synthase(NOS) terminator를 가진 pCAMBIA1300 plasmid의 XbaI, KpnI site에 waxy plus gus linker plus waxy inverse repeat fragment를 삽입하여 pCAMW-Ri를 구축하였다. SSS1 유전자 증폭을 위해 유전자 특이적인 SSS1-Fw(Kpn1) 5'-GGGGTACCTTGAAGATTGGACTATC-3' 와 SSS1-Rv(Cla1) 5'-CCATCGATTTCGAAGATCTGTTCACTG-3' 및 SSS1-Fw(Xba1) 5'-GCTCTAGAGCTTGAAGATTGGACTATC-3' 와 SSS1-Rv (EcoR1) 5'-GGAATTCCTTCGAAGATCTGTTCACTG-3' 프라이머를

제작하였고 자포니카 품종인 일품벼 유래의 cDNA에서 증폭하여 pCG plasmid에 각각 삽입하여 pCGS를 구축하였다. 그 후 SSS1 plus gus linker plus SSS1 inverse repeat fragment를 CaMV 35S promoter and the nopaline synthase(NOS) terminator를 포함한 pCAMBIA1300 plasmid의 XbaI, KpnI site에 삽입하여 pCAMS-Ri 벡터를 구축하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 유전자 과발현용 재조합 유전자 제작

(가) Glb::Sbe1의 식물형질전환용 재조합 유전자 제작

전분대사 중에서 amylopectin 합성에 관련된 주요 효소인 Sbe1, AGPL2, SUS2 등 유전자의 발현을 종자의 배유에 직접적인 발현을 유도하기 위하여 배유 특이 단백질인 globulin 단백질 유전자의 promoter(Glb)를 유전자의 promoter 부위에 부착하여 종자의 배유에 각 유전자의 과 발현을 유도하기 위하여 추가적으로 재조합유전자를 작성한 결과는 다음과 같다.

Sbe1 유전자는 Glb 프로모터에 Sbe1 유전자를 연결한 재조합 유전자를 제작하였다. 식물 유전자 운반체로서 Bar 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pMJ21(Jang et. al. 2003)을 기본벡터로 하여 작성한 pMJ-Glb (Cho et. al. 2009) 운반체의 multiple cloning site (MCS)에 Sbe1 유전자 ORF를 삽입하여 재조합 유전자를 **Figure 3-23**과 같이 제작하여 pMGR로 명명하였다.

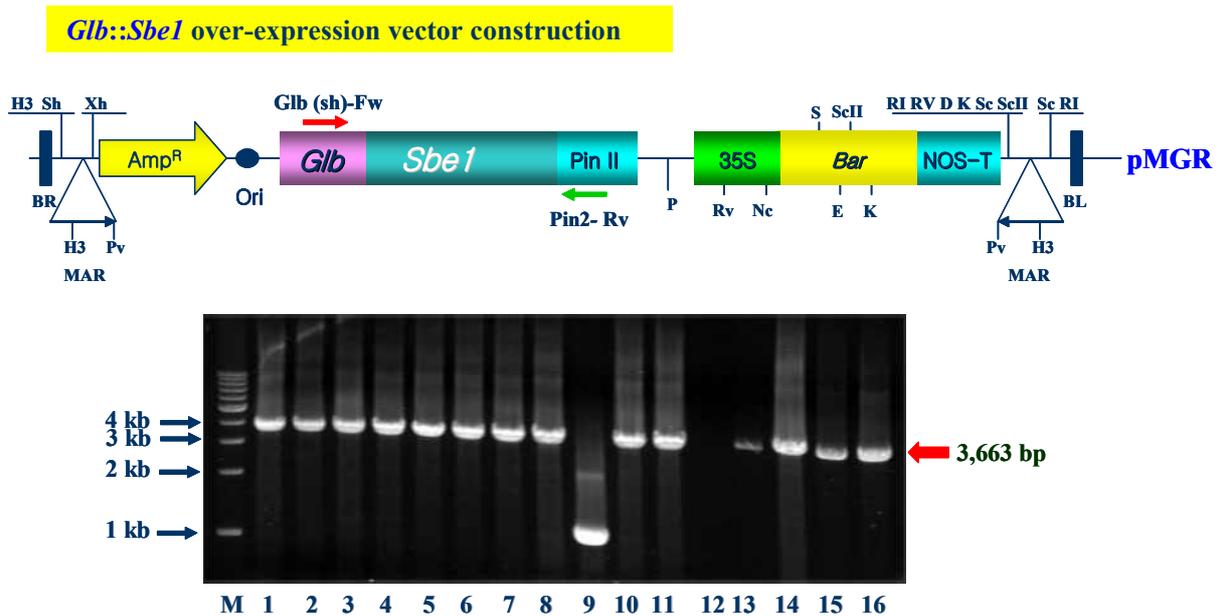


Fig. 3-23. Recombinant vector construction of Glb::Sbe1 (pMGR) and colony PCR to confirm the recombinant plasmids, Glb promoter plus Sbe1 (pMGR) using T7-Fw/PinII-Rv primer pairs (3,663 bp).

(나) Glb::AGPL2의 식물형질전환용 재조합 유전자 제작

AGPL2 유전자는 Glb 프로모터에 AGPL2 유전자를 연결한 재조합 유전자를 제작하였다. 식물 유전자 운반체로서 Bar 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pMJ21(Jang et. al. 2003)을 기본벡터로 하여 작성한 pMJ-Glb (Cho et. al. 2009) 운반체의 multiple cloning site (MCS)에 AGPL2 유전자 ORF를 삽입하여 재조합 유전자를 **Figure 3-24**와 같이 제작하여 pMGA로 명명하였다.

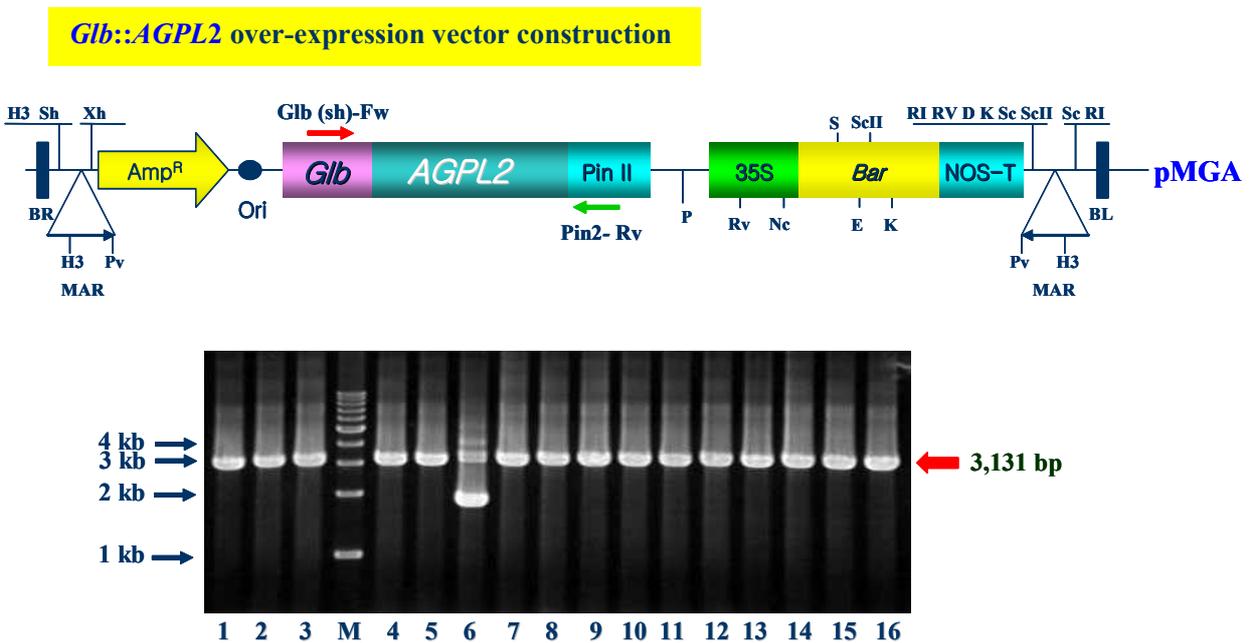


Fig. 3-24. Recombinant vector construction of Glb::AGPL2 (pMGA) and colony PCR to confirm the recombinant plasmids, pMGA using T7-Fw/PinII-Rv primer pairs (3,131 bp).

(다) Glb::SUS1의 식물형질전환용 재조합 유전자 제작

SUS1 유전자는 Glb 프로모터에 SUS1 유전자를 연결한 재조합 유전자를 제작하였다. 식물 유전자 운반체로서 Bar 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pMJ21(Jang et. al. 2003)을 기본벡터로 하여 작성한 pMJ-Glb (Cho et. al. 2009) 운반체의 multiple cloning site (MCS)에 SUS1 유전자 ORF를 삽입하여 재조합 유전자를 **Figure 3-25**과 같이 제작하여 pMGS로 명명하였다.

Glb::SUS1 over-expression vector construction

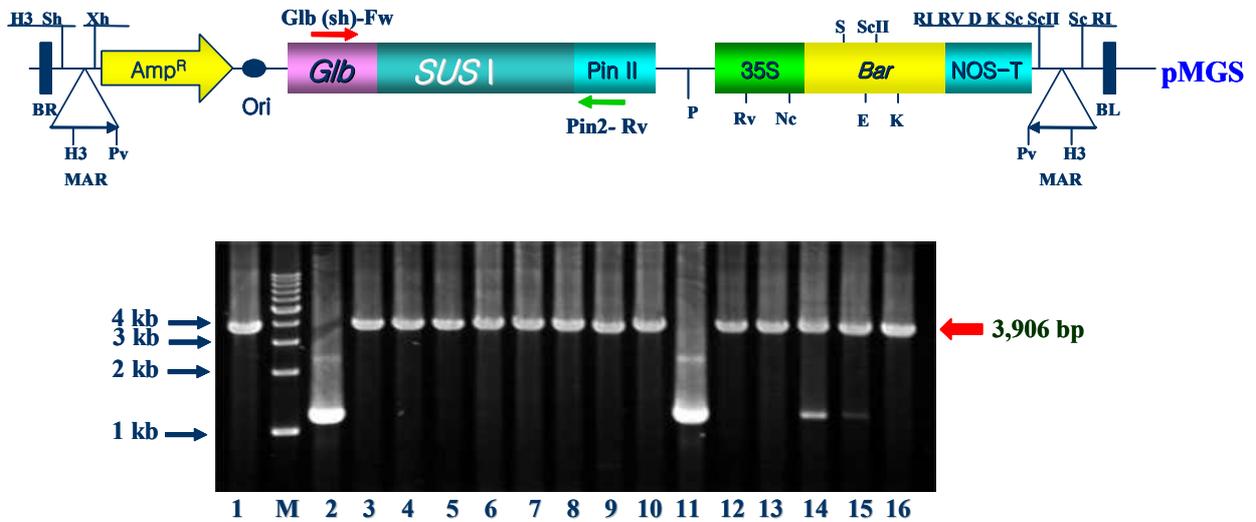


Fig. 3-25. Recombinant vector construction of Glb::SUS1 (pMGS) and colony PCR to confirm the recombinant plasmids, pMGS using T7-Fw/PinII-Rv primer pairs (3,906 bp).

(2) 유전자 발현억제용 재조합 유전자 제작

(가) Glb::Waxy-Ri의 식물형질전환용 재조합 유전자 제작

전분대사 중에서 **Figure 3-26**와 같이 배유 발달의 중기~후기에 많이 발현하여 amylose 합성을 촉매하는 효소인 Waxy와 SSS1 유전자의 발현억제를 유도하기 위하여 35S promoter를 유전자의 앞 부위에 부착하여 각 유전자의 발현억제를 유도함으로써 아밀로펙틴의 생산량을 증대시키기 위하여 추가적으로 재조합 유전자를 작성한 결과는 다음과 같다.

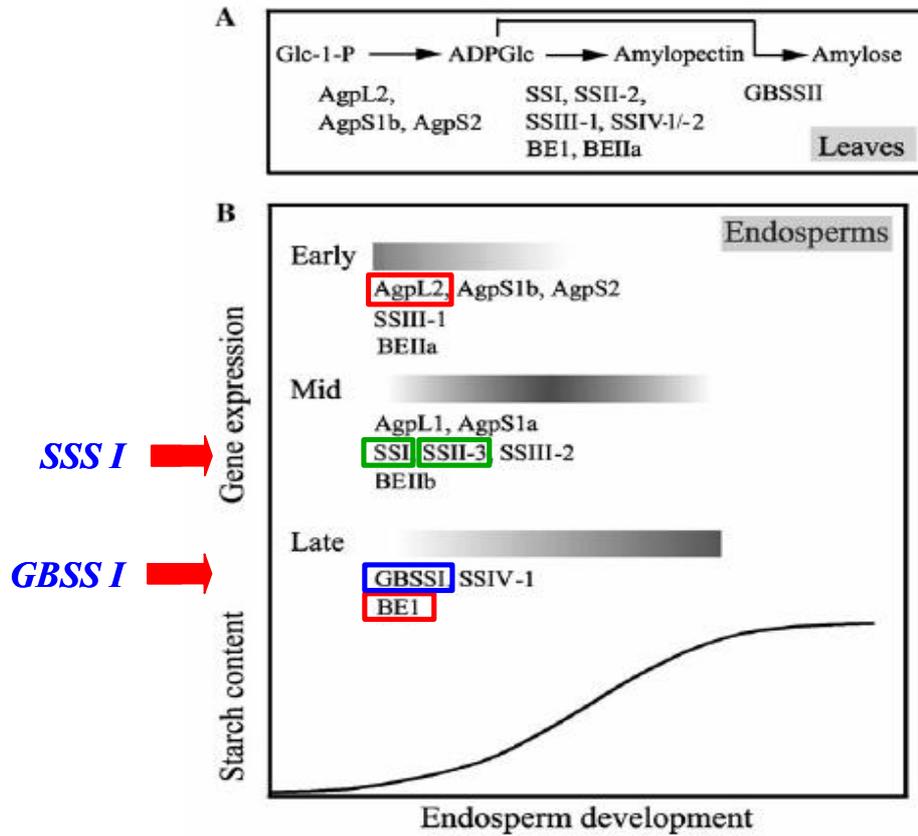


Fig. 3-26. Differential expression of the genes involved in starch biosynthesis in leaves and endosperms of cereals. (A) The expressed genes involved in starch biosynthesis in leaves. (B) Accumulation of starch in cereal seeds and expression patterns of genes that are involved in starch synthesis (Dian et al. 2005).

Waxy 유전자의 발현억제를 위한 RNAi 운반체의 제작은 식물 유전자 운반체로서 HPT 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pCAMBIA1300 (<http://www.cambia.org/>) 운반체에 발현억제를 위하여 Table 3-13에 제시한 바와 같이 Waxy 유전자(AK070431)의 conserved region으로부터 575 bp의 염기서열을 증폭하여 Gus linker DNA의 앞, 뒤에 상호 역방향으로 연결한 후 multiple cloning site (MCS)에 삽입하여 Figure 3-27와 같이 제작하여 pCAMW-Ri로 명명하였다.

Table 3-13. The target fragment sequence (575 bp) of Waxy gene for 35S::Waxy RNAi vector construction. Waxy gene of which expression product is GBSS1.

```
TCATGGTGATCTCTCCTCGGTACGACCAGTACAAGGACGCTTGGGATACCAGCGTTGTGGCT
GAGATCAAGGTTGCAGACAGGTACGAGAGGGTGAGGTTTTTCCATTGCTACAAGCGTGGAGT
CGACCGTGTGTTTCATCGACCATCCGTCATTCCTGGAGAAGGTTTGGGGAAAGACCGGTGAGA
AGATCTACGGACCTGACACTGGAGTTGATTACAAAGACAACCAGATGCGTTTTTCAGCCTTCTT
TGCCAGGCAGCACTCGAGGCTCCTAGGATCCTAAACCTCAACAACAACCCATACTTCAAAGG
AACTTATGGTGAGGATGTTGTGTTTCGTCTGCAACGACTGGCACACTGGCCCACTGGCGAGCT
ACCTGAAGAACAACACTACCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAGGTTGCTTTCTGCATC
CACAACATCTCCTACCAGGGCCGTTTCGCTTTCGAGGATTACCCTGAGCTGAACCTCTCCGA
GAGGTTTCAGGTCATCCTTCGATTTTCATCGACGGGTATGACACGCCCGGTGGAGGGCAGGAAGA
TCAACTGGATGAAGGCC
```

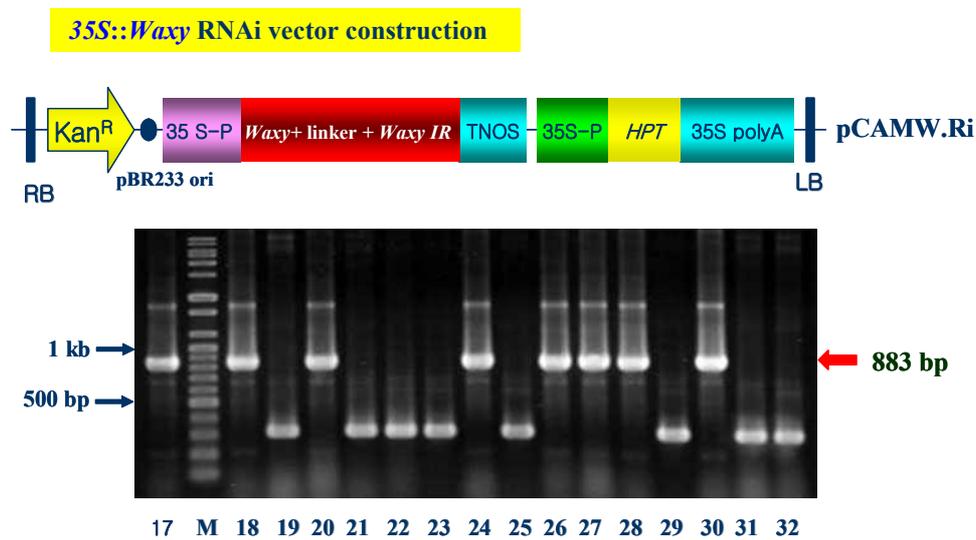


Fig. 3-27. Recombinant vector construction of 35S::Waxy-Ri (pCAMW-Ri) and colony PCR to confirm the recombinant plasmids, pCAMW-Ri using PIY primer pair (883 bp).

(나) 35S::SSS1-Ri의 식물형질전환용 재조합 유전자 제작

SSS1 유전자의 발현억제를 위한 RNAi 운반체의 제작은 식물 유전자 운반체로서 HPT 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pCAMBIA1300 운반체에 발현억제를 위하여 **Table 3-14**에 제시한 바와 같이 SSS1 유전자의 conserved region으로부터 일품벼로부터 cDNA를 합성하여 RT-PCR에 의하여 533 bp의 염기서열을 증폭하여 Gus linker DNA의 앞, 뒤에 상호 역방향으로 연결한 후 MCS에 삽입하여 **Figure 3-28**과 같이 제작하여 pCAMS-Ri로 명명하였다.

Table 3-14. The target fragment sequence (533 bp) of SSS1 gene for 35S::SSS1 RNAi vector construction.

```

TTGGAAGATTGGACTATCAAAAAGGCATTGATCTAATTAACTTGCCATTCCAGATCTCATG
CGGGACAATATTTCAATTCGTCATGCTTGGATCTGGTGACCCAGGTTTTGAAGGATGGATGAG
ATCCACAGAATCAGGGTACAGGGATAAATTTTCGTGGATGGGTTGGATTTAGTGTTCAGTTT
CCCACCGAATAACTGCAGGTTGCGATATATTGTTGATGCCATCCAGATTCGAACCTTGTGGC
CTCAATCAGCTATATGCTATGCAATATGGTACAGTGCCTGTTGTTTCATGGAAGTGGAGGCCT
CAGAGATACAGTGGAGAATTTTAACCCGTTTGTCTGAGAAAGGAGAGCAGGGTACAGGGTGGG
CATTCTCGCCACTAACCATTTGAAAAAATGCTGTGGGCATTGCGGATGGCAATTTTCGACATAC
AGGGAACACAAGTCTTCTTGGGAGGGTCTAATGAAGCGAGGCATGTCAAGCGACTTTACATG
GGACCATGCCGCCTCACAGTATGAACAGATCTTCGAA
    
```

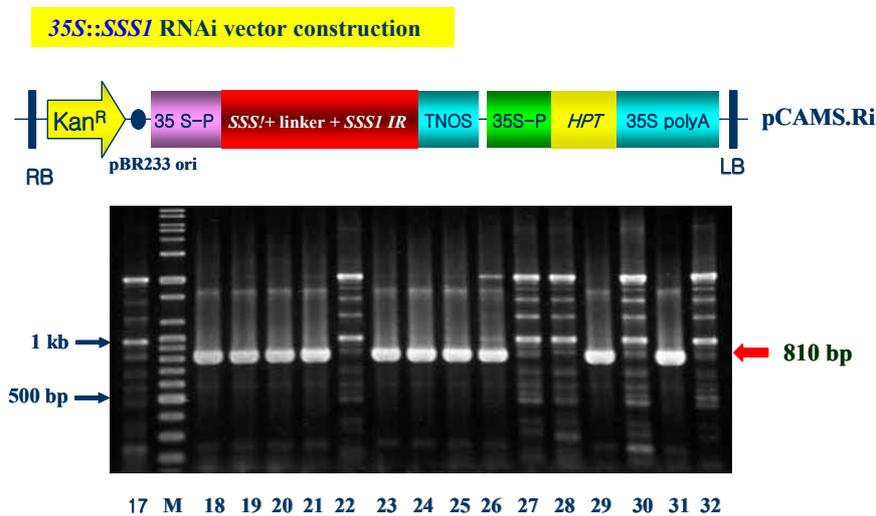


Fig. 3-28. Recombinant vector construction of 35S::SSS1-Ri (pCAMS-Ri) and colony PCR to confirm the recombinant plasmids, pCAMS-Ri using NOS-Rv/PIX-Rv primer pair (810 bp).

(3) 재조합 유전자의 형질전환 벼 분석 및 후대육성

(가) pCAMW-Ri가 도입된 형질전환 벼의 분석 및 후대육성

Waxy 유전자의 발현억제를 위해서 식물 유전자 운반체로서 HPT 유전자를 선발마커로 가지고 있는 pCAMBIA1300 운반체에 Waxy 유전자의 conserved region 575 bp를 GUS linker의 앞, 뒤에 연결하고 35S 프로모터 다음에 있는 MCS에 결합하여 제작한 pCAMW-Ri 재조합 유전자는 Agrobacterium 방법을 이용한 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 **Figure 3-10**과 같이 형질전환 하였다. 식물체 분화배지에서 재분화된 어린 벼는 조직배양실에서 2주 동안의 순화과정을 거친 다음 온실의 포트에 이식하여 종자 수확을 위하여 재배 중에 있다. 벼 식물체에서 유전자의 도입여부는 HTP 유전자의 HPT-Fw/Rv primer를 이용하여 PCR로 분석한 결과 **Figure 3-29**과 같이 380 bp의 밴드가 증폭되어 pCAMW-Ri 재조합 유전자의 도입이 확인되었다.

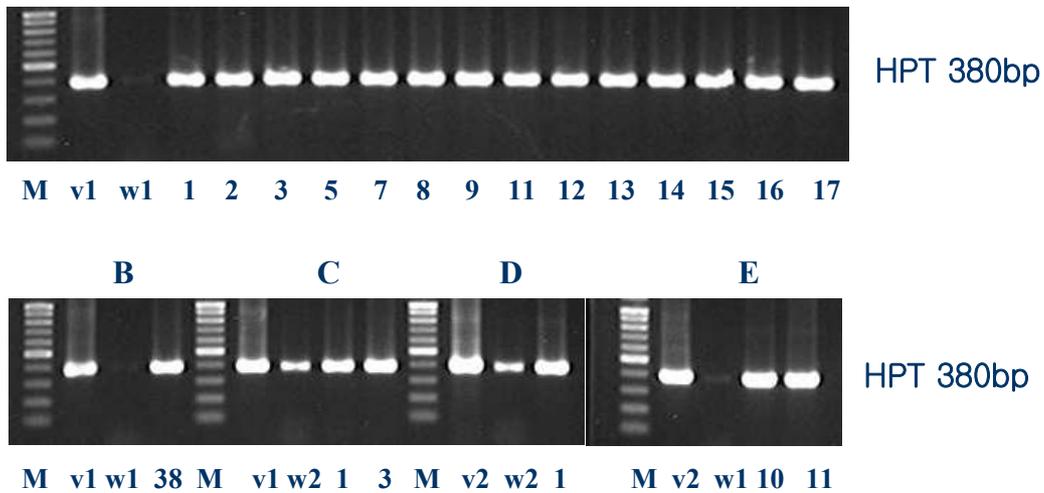


Fig. 3-29. PCR analysis of transgenic rice plants using HPT-Fw/Rv primer pair. A and B are Waxy RNAi vector(pCAMW-Ri) transformed Palgong plants; C are pCAMW-Ri transformed Gopum plants; D is the Souble starch synthase1 RNAi vector(pCAMW-Ri) transformed Gopum plants; E are the pCAMS-Ri transformed Palgong plants. v1, pCAMW-Ri vector; v2, pCAMS-Ri vector; w1, Palgong w2, Gopum.

(나) pMGR 및 pCAMW-Ri가 도입된 형질전환 벼의 분석 및 후대육성

Sbe1 유전자의 과발현과 Waxy 유전자의 발현억제를 동시에 얻을 수 있는 형질전환 벼 계통의 생산을 위해서 Sbe1 유전자를 삽입한 pMGR 재조합 유전자와 Waxy 유전자를 RNAi로 삽입한 pCAMW-Ri 재조합 유전자를 동시에 Agrobacterium cell에 도입하여 증식한 Agrobacterium cell을 접종하여 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 형질전환 하여 삼광벼와 삼남벼 종자에 접종한 처리에서 다수의 형질전환 벼를 육성하였다. 이들 형질전환 벼의 잎에서 DNA를 추출하여 pMGR에 있는 Bar 유전자와 pCAMW-Ri에 있는 HPT 유전자 primer를 사용하여 genomic DNA를 PCR로 증폭한 결과 **Figure 3-30**과 같이 삼광벼를 처리한 형질전환 계통인 sg1과 sg2에서 HPT 유전자(A1)와 Bar 유전자(A2)를 모두 포함하는 형질전환 벼가 육성된 것을 확인하였으며, 삼남벼를 처리한 sn1에서도 HPT 유전자(B1)와 Bar 유전자(B2)를 모두 포함하는 형질전환 벼 계통의 육성이 확인되었다. 따라서, 이 계통들은 앞으로 동일 형질전환 개체내에 2개의 유전자가 동시에 형질전환되었을 때의 유전양상과 아밀로스과 아밀로펙틴의 생합성기작을 연구하는데 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

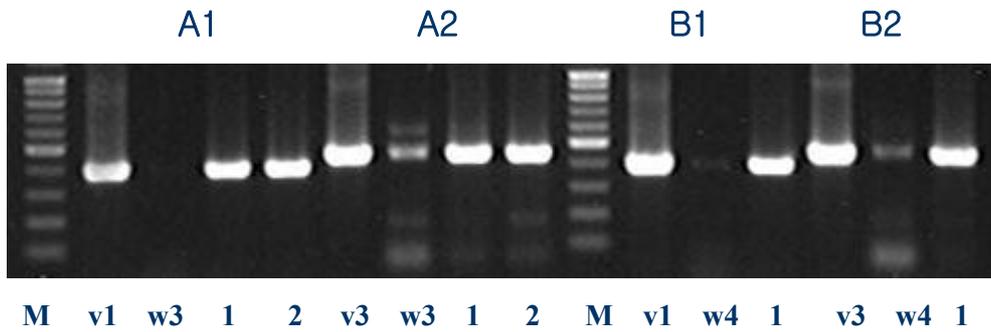


Fig. 3-30. PCR analysis of Sbe1 over-expression/Waxy RNAi (pMGR/pCAMW-Ri) co-transgenic rice plants using HPT-Fw/Rv and Bar-Fw/Rv primer pair, respectively. A1, transformed Samgwang rice plants (sg1 and sg2) were detected by HPT primer; A2, sg1 and sg2 were detected by Bar primer; B1; transformed Samnam rice plants(sn1) was detected by HPT primer; B2, sn1 plant was detected by Bar primer. v1, pCAMW-Ri vector; v3, pMGR vector; w3, Samgwang w4, Samnam.

(다) pMGR 재조합 유전자가 도입된 형질전환 벼의 분석 및 후대육성

벼 종자 유래의 Glb 프로모터에 Sbe1 유전자를 연결한 재조합 유전자 pMGR 재조합 유전자를 Agrobacterium cell에 도입하여 증식한 Agrobacterium cell을 접종하여 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 형질전환 하여 고품벼와 팔공벼 종자에 접종한 처리에서 다수의 형질전환 벼를 육성하였다. 이들 형질전환 벼의 잎에서 DNA를 추출하여 pMGR에 있는 Bar 유전자 primer를 사용하여 genomic DNA를 PCR로 증폭한 결과 **Figure 3-31**와 같이 고품벼를 처리한 형질전환 계통인 gp9, gp10, gp11, gp12에서 Bar 유전자(A)가 도입된 형질전환 벼가 육성된 것을 확인하였으며, 팔공벼를 처리한 pg1, pg2에서도 Bar 유전자(B)가 도입된 형질전환 벼 계통의 육성이 확인되었다.

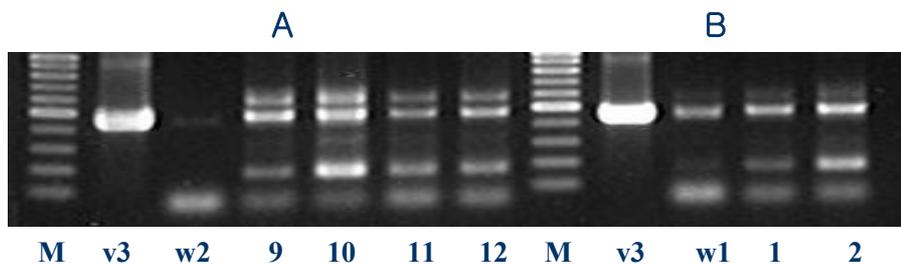


Fig. 3-31. PCR analysis of Sbe1 overexpression (pMGR) transgenic rice plants using Bar-Fw/Rv primer pair. A, transformed Gopum rice plants (gp9, gp10, gp11 and gp12) were detected by Bar primer; B, transformed Palgong rice plants(pg1 and pg2) were detected by bar primer. v3, pMGR vector; w1, Palgong w2, Gopum.

(라) pMGA, pMGS, pCAMS-Ri 재조합 유전자가 도입된 형질전환 벼의 육성

벼 종자 유래의 Glb 프로모터에 AGPL2, SUS1 유전자를 연결한 재조합 유전자 pMGA, pMGS 재조합 유전자와 35S에 SSS1 유전자의 발현억제를 위한 RNAi 운반체로 제작한 pCAMS-Ri를 Agrobacterium cell에 도입하여 증식한 Agrobacterium cell을 접종하여 벼 종자 단기 형질전환방법을 사용하여 형질전환 하여 고품벼, 삼광벼, 팔공벼, 삼남벼 종자에 접종한 처리에서 다수의 형질전환 벼를 육성하였다. 이들 형질전환 벼의 잎에서 DNA를 추출하여 pMGA와 pMGS에 있는 Bar 유전자 primer를 사용하고 pCAMS-Ri 재조합 유전자는 HPT 유전자의 도입 여부를 잎에서 분리한 genomic DNA를 PCR로 증폭하여 목표 유전자의 도입 여부를 형질전환 벼 계통에서 확인 중에 있다.

제4절 <제2협동과제> 벼 지질대사 및 대사산물과 식미와의 연관성 분석

1. 재료 및 방법

가. 시험 재료

식미에 차이가 있는 고품(고식미)과 팔공(저식미) 2품종, 그리고 삼광, 고품, 추청, 일품, 팔공, 삼남, 도봉 등 7품종을 고식미군, 중식미군, 저식미군으로 분류하여 시료군으로 사용하였으며, 고시히까리, 삼광, 고품, 추청, 화성, 동진, 일품, 화청, 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 등 총 12 품종 쌀 시료를 최고 식미 개발용 시료로 사용하였다.

모든 쌀 시료는 시험용 도정기(Yamamoto Ricepal 32, Toyo, Japan)를 이용하여 약 92% 표준 도정하였고, 쌀가루 시료는 food mixer(CM-MM3900, (주)제이월드)로 분쇄한 후 100 mesh 체를 통과시켜 사용하였다.

저장에 따른 쌀의 특성 변화를 알아보기 위해 백미를 밀폐된 플라스틱 용기에 담아 30℃ 항온기에 3개월 동안 저장한 후 -20℃에 냉동보관 하여 시료로 사용하였다.

배유 전분 분획은 쌀 곡립으로부터 알칼리 침지법 (Yamamoto et al., 1973)에 의하여 각각 분리하였다. 즉, 쌀을 50 mM LiOH (lithium hydroxide)에 침지시킨 후 막자사발로 갈아서 isoamylalcohol, acetone, ethylalcohol 처리에 의해 단백질 및 지질 분획을 제거하였으며, 상층은 제거하고 전분 침전물을 회수하여 풍건시켜 건조한 후 분쇄하여 데시케이터에 보관하면서 사용하였다.

나. 실험 방법

(가) 시료별 쌀의 취반 특성

(1) Toyo 식미치

백미 33 g을 취하여 식미기에 있는 항온수조의 물이 적정온도에 도달하면 10분간 취반한 후 상온에서 뜸들이기를 한 다음 식미측정장치에 넣어 식미치를 측정하였고 Toyo-value로 나타내었다.

(2) 취반 쌀의 관능검사

20 g의 쌀을 부서지지 않도록 2~3회 가볍게 씻은 후 예비실험 결과를 바탕으로 쌀과 물의 비율이 1:1.3이 되도록 물을 첨가하여, 실온에서 30분간 침지한 후 20분간 가열 후 10분간 뜸들여서 취반하였으며, 경북대학교 식품영양학과 대학원생 9명의 관능검사요원을 선정하여 쌀밥의 관능특성들에 대해 인지하도록 훈련시킨 후 색, 윤기, 구수한 맛, 조직감, 전반적인 기호도 등 5개 항목에 대하여 평가하였으며 7점 척도법으로써 각 특성은 척도상에 점수가 작을수록 강도가 약해지고 점수가 클수록 강해지는 것을 나타내었다.

(3) 취반 쌀의 기계적 물성 측정

식미 관능검사와 동일한 조건으로 취반 한 후, 60℃ incubator 안에서 1시간 보관하여 안정

화시킨 후 신속하게 측정하였다. 밥알의 크기가 중간이고 모양이 온전한 것을 핀셋으로 조심스럽게 test table 위에 높이가 평행이 되도록 놓아 측정하였다.

모든 측정은 20회 이상 측정하였고 이를 2회 반복하였다. 각 시료를 동일한 조건으로 취반한 쌀밥의 텍스처 특성을 조사하기 위하여 Texture Analyzer (Model TA-XT2, Stable Micro System, Haslemere, UK)를 사용하여 two-bite compression test를 실시하였고, two-bite compression test를 실시하여 얻어진 texturogram으로부터 경도(hardness), 부착성(adhesiveness), 탄성(springiness), 응집성(cohesiveness), 검성(gumminess)을 각각 구하였다.

Operation condition of Texture Analyzer for texture profile analysis of cooked rice

Type	Two bite compression test
Pre test speed	3.0 mm/s
Test speed	1.0 mm/s
Post test speed	1.0 mm/s
Trigger force	5 g
Distance format	80% strain

(나) 시료별 쌀 곡립 단면 및 전분입자의 형태 관찰

쌀 곡립 단면을 주사 전자현미경(Scanning electron microscope, Hitachi S-4200, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 금으로 도금시켜 전도성을 갖게 한 후 15 kV에서 30배 및 1000배의 배율로, 그리고 쌀 배유 전분 입자는 5000, 10000 배율로 입자의 형태를 각각 관찰하였다.

(다) 호화 특성 분석

(1) 팽윤력 측정

쌀가루와 전분의 팽윤력은 Li & Yeh(2001)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 100 mg(dry weight basis)을 취하고 증류수 10 ml를 가하여 현탁시킨 다음 55℃~95℃의 각 온도에서 1시간 150 rpm의 속도로 교반 항온수조에 유지시켰다. 내용물은 실온이 될 때까지 재빨리 냉각시키고 원심분리(8,000 × g, 30분)하여 침전된 시료무게와 상등액을 105℃에서 향량이 될 때까지 건조시켜 얻은 무게를 재어 팽윤력을 측정하였다.

$$\text{용해도 (\%)} = \frac{\text{침전된 무게} \times 100\%}{0.1}$$

$$\text{팽윤력 (g/g)} = \frac{\text{침전된 무게} \times 100}{\text{시료의 무게} \times (100\% - \text{용해도})}$$

(2) 신속점도계에 의한 쌀가루의 호화특성

가열에 의한 쌀가루의 호화점도 특성은 Rapid Visco Analyzer(RVA-4, Newport Scientific, Australia)를 이용하여 측정하였다. RVA 원형용기(sample canister)에 쌀가루 3 g 과 증류수 25 ml를 넣은 다음 10초간 960 rpm으로 회전시켜 쌀가루 현탁액을 만들고 분석 완료 시까지 회전속도를 160 rpm을 유지하였다. 가열온도는 50℃에서 1분간 유지한 다음 95℃까지 1분당 12℃로 가열하고 95℃에서 2.5분간 유지시킨 다음 50℃까지 냉각시키고 2분간 유지하였다. RVA viscogram으로부터 호화개시온도(initial pasting temperature), 최고점도(peak viscosity), 최저점도(trough viscosity), 최종점도(final viscosity), 강하점도(breakdown, 최고점도-최저점도) 및 치반점도(setback, 최종점도-최고점도)등의 RVA 특성을 조사하였다.

(라) 쌀 배유 지질 성분 분석

(1) 총지방질(non-starch lipid) 추출 및 구성 지방산 조성 분석

비전분지질(non-starch total lipids, NSTL) 분석은 쌀가루 시료에 CHCl₃ : MeOH (2:1, v:v)을 용매로 하여 추출하였으며 총지방질을 Nike et al. (2004)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 methyl ester화 시켰다. Methanolic potassium hydroxide 용액과 1.2 N HCl-MeOH 용액으로 각각 70~75℃에서 검화 후 n-hexane을 실온으로 냉각한 methyl ester화된 지방산 혼합물에 넣고 vortex한 후 원심분리 하였다. 상층의 n-hexane 층을 회수하여 얻은 fatty acid methyl ester (FAME)를 증류한 다음 100 μ l의 n-hexane을 가하여 FAME를 녹이고 지방산 GC 분석 시료로 사용하였다. 시료는 gas chromatography-mass spectrometer(GC: 6890 plus, Hewlett Packard Co, Palo Alto, CA, Mass: JMS700, JEOL, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. 분석 조건으로 칼럼은 DB-225 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), 이동상 기체는 He을 사용하였고, Injector temperature는 250℃, Column temperature는 140℃에서 2분간 유지한 후 5℃/min의 속도로 200℃까지 승온 후 10℃/min의 속도로 220℃까지 승온 시켜 온도를 유지하였다. Flow rate는 1ml/min, injection 양은 1 μ l로 하여 분석하였으며 각 봉우리 면적에 대한 상대적인 백분율로 구성 지방산의 조성비를 표시하였다.

(2) 식물성 스테롤류(phytosterols) 조성 함량 분석

시료로부터 추출한 총지질에 ethanol을 가하고 80℃의 항온수조에서 10분간 진탕 후 50% KOH 용액을 1 ml 가하여 80℃에서 10분간 검화를 실시하였다. 신속히 냉각하고 증류수와 ethyl ether를 가한 후 잘 혼합하여 분액여두에 취하였으며 추출한 상층액을 Na₂SO₄로 탈수시킨 후 감압농축 하였다. 농축 건조된 물질은 1 ml chloroform으로 용해하여 0.2 μ m syringe filter로 여과하여 분석 전까지 냉동보관 하였다. 내부 표준 물질인 5 α -cholestane, standard 물질인 squalene, sitosterol, stigmasterol, campesterol은 Sigma사로부터 구입하였고 각각 1000 ppm 농도로 제조 후 GC로 분석하여 retention time을 구하였다. GC-MS(HP 6890, Hewlett-Packard Co., Japan)를 이용한 분석 조건은 다음과 같다. Column은 HP-5(30 m \times 0.25mm \times 0.25 μ m), injector temperature는 250℃에서 1분간 유지한 후 2℃/min의 속도로 300℃까지 승온시켜 5분간 유지하였다. Carrier gas는 He을 사용하였고 Flow rate는 1 ml/min, injection

volume은 1 μ l로 하여 분석하였다. 분석된 성분의 함량은 내부표준물질(5 α -cholestane)의 면적과 불검화물질의 면적비에 의해 각 함량을 나타내었다.

(마) 지질과산화 관련 효소활성 분석

(1) Lipase 활성도 측정

시료에 n-hexane을 가하여 탈지처리한 후 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 균질화 및 원심 분리(4 $^{\circ}$ C, 10,000 \times g, 30분)하여 얻은 상등액을 lipase 활성 측정용 조효소액 분획으로 사용하였다. Crude lipase 분획 10 mL에 7.5% gum acacia 2 mL, tributyrin 1 mL을 가한 유화액을 30 $^{\circ}$ C에서 경시적으로 반응시킨 후 상등액을 취하여 methanol 가하여 반응을 정지시키고 diethyl ether : ethanol (2:1, v:v) 용액을 넣어주고 phenolphthalein을 지시약으로 하여 ethanolic 0.1 N potassium hydroxide 용액으로 적정하였다. 반응전과 반응후의 반응액 1 mL 내에 해리된 지방산양을 측정함으로써 lipase 활성을 조사하였다(Prabhu et al., 1999; Kim, 2004). Lipase 활성도는 단위 시간당 지방산을 유리하는 양을 1 unit로 하였다.

(2) Lipoxygenase 활성도 측정

Lipoxygenase 활성 측정을 위한 조효소액은 시료 1 g에 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 10 mL를 첨가하여 30분간 추출한 후 원심분리(10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 30분)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소활성 측정용 기질로는 10 mM linoleic acid에 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)을 희석한 용액을, 즉 linoleic acid를 70 mg 취한 후 여기에 동량의 Tween 20을 가하여 균질화 시키면서 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)을 기포가 생기지 않도록 가하여 총량이 25 mL가 되도록 정용한다. Lipoxygenase 활성 측정은 큐벳에 10 mM linoleic acid를 50 배 희석한 용액 2.9 mL와 조효소액을 10배 희석한 액 0.1 mL을 넣고 반응시켜 생긴 과산화물을 UV/Visible spectrophotometer(DU 800 series, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA)를 이용하여 234 nm에서의 흡광도 변화로 측정하였으며 이때 측정 온도는 25 $^{\circ}$ C로 하였다. 분당 0.001의 흡광도 증가를 1 unit로 하였다(Kim & Rhee, 1997). 기질 완충액(pH 9.0)은 Hildebrand et al. (1991)의 방법으로 만들었으며 Tween 20 0.65 mL, 0.02% citric acid 1 mL, linoleic acid 250 mg을 넣어 균질화한 후 이에 0.2 M borate buffer(pH 9.0)를 넣어 linoleic acid 농도가 2.57 mM이 되도록 조정후 사용하였다.

(바) 쌀 배유 전분분자의 이화학적 특성 분석

(1) 아밀로오스 쇄장 비교

쌀 전분 시료 12 mg을 알칼리 호화 시킨 후 acetic acid로 중화시키고 1% I2-10% KI 용액을 첨가하여 정색반응을 시켰다. 자외/가시선 분광계(DU 800 series, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA)에 의해 500 nm 에서 700 nm 까지 흡광도를 측정하였다. 아밀로오스 함량은 함량별 순수 아밀로오스(Sigma, St Louis, U.S. A)를 이용하여 680 nm에서의 흡광도를 바탕으로 검정회귀식을 만든 후(Fig. 4-1) 계산하였다.

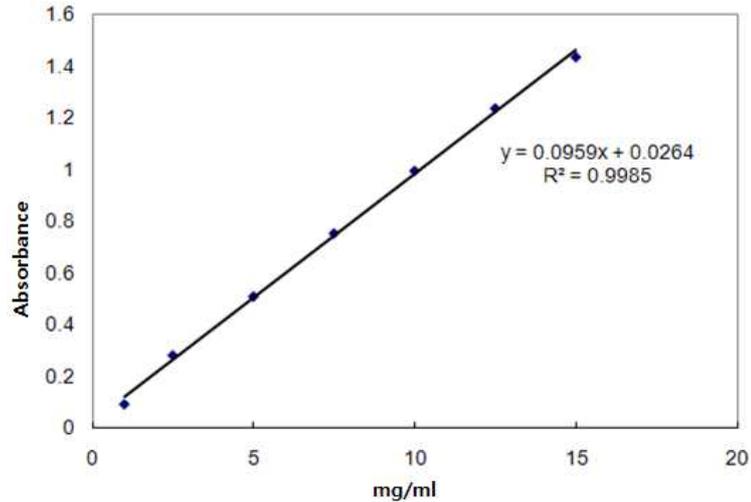


Fig. 4-1. Standard curve of amylose contents.

(2) 전분지질(starch lipid) 함량 및 구성 지방산 조성 분석

쌀 배유 조성 총 전분지질은 분리한 쌀 전분에 75% n-propanol을 용매로 하여 100℃에서 연속적으로 2시간 2회 추출한 용액을 모아 농축 건조시킨 다음 CHCl₃ : MeOH (2:1, v/v) 혼합액으로 3번 추출하여 다시 감압 건조시킨 다음 에탄올로 씻어 건조하여 제조하였다. 추출한 전분 지질을 Nike et al. (2004)의 방법에 따라 methanolic potassium hydroxide 용액으로 검화하여 지방산을 분리하고 methylation을 거쳐 Gas chromatography-Mass spectrometer(GC: 6890 plus, Hewlett Packard Co, Palo Alto, CA, Mass: JMS700, JEOL, Tokyo, Japan)를 이용하여 지방산 조성을 분석하였다. 분석 조건으로 칼럼은 DB-225 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 이동상 기체는 He를 사용하였고, Injector temperature는 250℃, Column temperature는 140℃에서 2분간 유지한 후 5℃/min의 속도로 200℃까지 승온 후 10℃/min의 속도로 220℃까지 승온시켜 온도를 유지하였다. Flow rate는 1ml/min, injection 양은 1 μl로 하여 분석하였으며 각 봉우리의 면적에 대한 상대적인 백분율로 구성 지방산의 조성비를 표시하였다

(3) DSC (Differential scanning calorimetry)에 의한 전분 호화 특성

전분의 열역학적 특성은 시차주사열량기(TA 4000, TA Instruments, New Castle, DE)를 이용하여 시료와 수분의 비율이 1:2가 되게 aluminium pan에 담고 밀봉한 다음 상온에서 수분 평행에 도달하도록 방치한 후 사용하였다. 측정온도를 35℃도부터 95℃까지 10℃/min로 승온시키면서 흡열곡선을 얻었으며 reference는 sample pan과 동일한 pan을 온도보정 후 사용하였다. 이 때 냉각 매체로는 질소 가스를 사용하였다. DSC thermogram 으로부터 호화개시온도(onset temperature, T_o), 호화정점온도(peak temperature, T_p), 호화종료온도(conclusion temperature, T_c)를 구하고 흡열피크의 면적으로부터 호화엔탈피(enthalpy, ΔH)를 구하였다.

(4) 전분입자의 X선 회절도 측정

X-ray diffraction pattern은 직접적으로 결정구조 사이의 원자의 배열에 영향을 받는다. 회절 빔과 투과빔 사이의 회절각 2θ를 측정하였다. 쌀 전분 입자의 결정성과 결정강도는 X선 회절

기(Philips, X' pert PW3710, Netherland)를 이용하여 Target: Cu-ka, scanning speed; 0.04° 2 θ /s, voltage; 30kV, current; 20mA의 조건으로 회절각도(2 θ)를 5°부터 40°까지 회전시켜 나타나는 피크의 위치와 높이로써 결정성과 결정 강도를 비교하였다. 회절곡선의 극대치(peak)의 위치는 결정면의 간격을, 높이는 결정의 크기를 나타낸다.

(5) 배유 전분립의 Glucoamylase에 의한 가수분해도 비교

전분 100 mg에 0.4% acetic acid buffer(pH 4.8) 9 mL와 1% 효소액(amyloglucosidase, Fluka, Buchs, Switzerland) 60 unit를 첨가하여 37°C에서 반응시키면서 경시적인 가수분해도를 측정하였다. 반응액 100 μ l를 채취하여 1.9 mL 증류수를 첨가하고 100°C에서 10분간 중탕시켜 가수분해 반응의 정지와 더불어 전분을 호화시켰다. Total sugar 함량은 phenol-sulfuric acid 법(Dubois et al., 1956)으로 가수분해되어 유리되는 glucose 함량은 glucose-oxidase peroxidase 법(Loyd and Whelan, 1969)으로 측정하여 가수분해도를 측정하였다.

(사) 당 조성 분석

쌀 배유에 함유되어 있는 비전분성 당은 Englyst et al.(1992)의 방법에 따라 각가 분석하였다. 쌀가루로부터 dimethylsulfoxide(DMSO)을 가하고 termamyl 등(pH 5.2)의 효소처리에 의해 비전분성 다당류를 분리한 후 다당류를 황산으로 가수분해 시킨 후 gas chromatography에 의해 구성당의 함량 및 성분 조성을 분석하였다. GC-Mass(GC: 6890 plus, Hewlett Packard Co, Palo Alto, CA, Mass: JMS700, JEOL, Tokyo, Japan)의 분석 조건으로 칼럼은 DB-225 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), carrier gas; He, injector temperature; 250°C, column temperature; 150°C에서 2 min, 4°C/min의 속도로 230°C까지 승온 후 10분간 온도를 유지하였다. Flow rate는 1 ml/min, injection 양은 1 μ l로 하여 분석하였으며 성분 당은 internal standard인 allose의 양을 기준으로 하여 peak의 면적을 계산하고 상대적인 백분율로 나타내었다.

(아) 단백질 함량

조단백질 함량은 AOAC 방법에 의해 Kjeldal에 의해 측정하였다. 시료 0.5 g을 취한 후 K₂SO₄와 H₂SO₄ 첨가하여 분해 장치에서 완전히 분해시킨 후 Kjeldahl nitrogen/protein analyzer(Kjeltec 2400 auto analyzer, Foss Tecator, Sweden)를 이용하여 질소함량을 구한 후 질소량에 5.95를 곱한 값으로 나타내었다.

(자) 유리아미노산 분석

쌀가루 시료를 1000 μ l 증류수에 녹인 후 50 μ l를 분주하여 분석하였다. 시료 각각을 완전히 건조시키고 PITC(phenylisothiocyanate)로 유도체화 시킨 후 1.4 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN, pH 6.1로 녹인 후 상층액을 HPLC(SMART/HPLC 1100, Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA)를 이용하여 분석하였다. HPLC chromatogram의 peak area를 standard에 기준하여 산출하였다.

<HPLC conditions for amino acid analysis of rice>

Column	Waters Symmetry C18 (4.6 × 250mm, 5 μm)
Column oven temp.	46 Celsius
HPLC pump	HP 1100 Series, Binary Pump
HPLC injector	HP 1100 Series, Autosampler
Variable Wavelength Detector	HP 1100 Series, 254 nm
Solvent	A) 1.4 mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH ₃ CN, pH 6.1, B) 60% CH ₃ CN
Elution	Linear gradient of solvent B (0~100%)
Flow rate	1.0 ml/min
Run time	50 min
Equil. time	10 min
Injection vol.	standard 4 μl, samples 100 μl

(차) 쌀 배유 미량원소 함량 분석

쌀 가루 시료를 테프론 용기에 넣고 HNO₃을 첨가한 후 약 200°C hot plate에서 산 분해시킨 후 침전물이 모두 분해되면 잔류하는 산을 휘발시키고 증류수를 첨가하여 ICP-OES(iCAP 6000 series, Thermo Co.)로 분석한다. 각 미량원소의 함량은 표준 내부물질로 표준곡선을 작성하여 측정하였다.

(카) 통계분석

실험 결과는 SPSS 15.0 Package를 이용하여 평균과 표준편차를 구하고 각 항목의 평균값의 차이는 p<0.05 유의수준에서 분산분석을 이용하여 검증하였으며 Duncan의 다중범위비교 (Duncan's multiple range test)를 통하여 차이를 확인하였다. 또한 식미치와 각 배유 성분간의 상관관계는 Pearson의 상관계수로 나타내었고 저장에 따른 각 시료의 저장 전과 저장 후의 결과 분석은 Student's t-test로 각각의 유의성 차이를 검증하였다.

2. 연구 수행 결과

가. 식미에 두드러진 차이가 있는 2품종 쌀 곡립의 이화학적 특성

(1) 쌀 곡립 단면과 전분입자의 SEM 관찰

주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 사용하여 취반 및 식미를 결정하는 쌀 입자의 구조, 전분 및 비전분 구성 성분들의 역할 등 미세구조를 확인이 가능하다. 쌀을 가로로 절단하여 단면을 30배, 1000배로 확대하여 관찰한 결과(Fig. 4-2) 모양은 약간 신장된 타원형 이었으며 전분, 단백질 등 여러 배유세포들이 뭉쳐있어 공간 없이 빈틈없는 덩어리를 이루고 있었다. 전분립의 틈새에는 주로 단백질 입자로 채워져 있었으며 팔공 전분립이 고품보다

더 작고 촘촘히 뭉쳐있으며 전분립의 주변을 둘러싸고 있는 단백질의 양이 더 많음을 알 수 있다. 전분은 쌀 건조중량의 약 90% 이상을 차지하고 있으며 amylopectin과 amylose가 선상으로 배열되어 있으며 종자가 수정된 후 성숙과정에서 배유세포는 amyloplast를 형성하여 다양한 크기와 모양의 전분입자를 가지게 된다(Kim et al., 1996). 고배율($\times 10000$)의 주사전자현미경 상에서 전분들은 단독 또는 복합 전분입자의 형태로 모양은 다각형의 형태를 하였으며 그 크기는 다양하였으나 대체로 직경이 약 $3.5\sim 4\ \mu\text{m}$ 로 나타났다. 고품전분은 팔공전분보다 다각형의 모양이 더 선명하고 균질하고 매끄러운 형태를 보였다(Fig. 4-3).

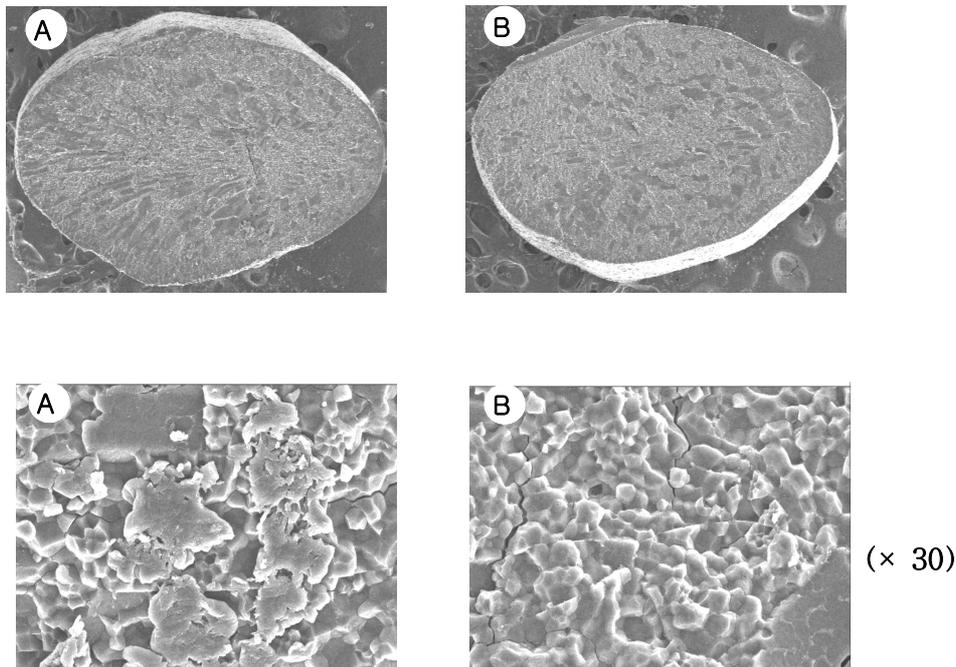


Fig. 4-2. Scanning electron micrographs of cross-sectioning rice grain.
($\times 30$, $\times 1000$). A: Gopumbyeo, B: Palgongbyeo

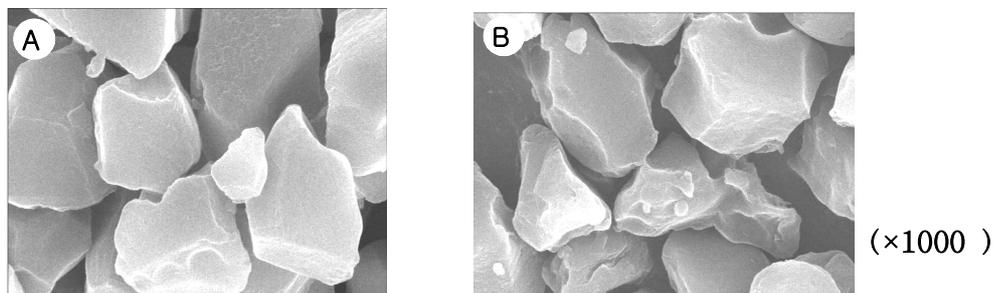


Fig. 4-3. Scanning electron micrographs of rice starches ($\times 10000$).
A: Gopumbyeo, B: Palgongbyeo

(2) 취반 식미 특성

토요식미기 측정치와 취반 후 밥의 색, 윤기, 구수한 냄새, 차진정도, 전반적인 기호도 등에

대한 관능검사의 결과를 Table 4-1에 나타내었다. 본 실험에 사용한 두 종류 쌀 품종의 토요식미계에 의한 식미치(Toyo value)는 고품이 76, 팔공은 66으로 품종 간 유의적인 차이가 있음을 확인할 수 있다. 그리고 취반 후, 관능검사의 항목 중, 식미치를 반영한다고 볼 수 있는 전반적인 기호도 역시 7점 평가에서 고품은 5.9, 팔공은 3.4로써 두 품종 간 t-검정에서 고도의 유의적인 차이($p<0.001$)를 나타내고 있음을 알 수 있다. 또한 이들 두 품종 간에는 색, 윤기, 구수한 밥 냄새, 차진정도 등에서도 유의적인 차이가 있었다. 본 실험에 사용한 고품과 팔공 두 품종의 쌀은 토요 식미치와 관능검사 결과 간에도 높은 상관성을 보이면서 식미에 두드러진 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

Table 4-1. Palatability and sensory evaluation scores of cooked rice varieties

Variety	Toyo-taste value	Sensory evaluation scores				
		Color	Glossiness	Roasted nutty taste	Cohesiveness	Overall preference
Gopumbyeo	75.50±0.20***	6.25±0.46***	6.13±0.64***	6.00±0.53***	5.88±0.35***	5.88±0.64***
Palgongbyeo	66.03±0.50	4.25±1.03	3.50±0.53	3.88±0.64	3.50±0.53	3.38±0.51

Mean value ± SD.

*** : significant at $p<0.001$ by the t-test.

(3) 쌀 함유 지용성 성분 변이

(가) 현미와 백미의 지질(non-starch lipid) 함량 및 지방산 조성 비교

쌀 함유 비전분지질(non-starch lipid, 유리지질)은 배아(embryo), 호분층(aleurone layer)에 주로 많이 분포되어 있다. 도정도에 따른 지방산 조성 차이를 알아보기 위하여 두 품종 현미와 백미의 전체 지방함량 및 지방산 조성을 비교하였다(Table 4-2). 지방함량은 현미의 경우 2.76~2.80%, 백미는 0.87~0.89%의 분포를 보였으며 두 품종 간 차이는 크지 않았다. 지방산 조성을 비교해보면, 현미의 경우 두 품종 모두 oleic acid 조성비(42.62~43.78%)가 가장 높았으며 linoleic(35.18~36.89%), palmitic acid(15.50~16.22%) 순으로 이들 조성이 대부분을 차지하고 있었다. Palmitic acid의 경우 고품 현미(16.22%)가 팔공(15.50%)보다 유의적으로 높은 조성비를 나타내었으며 myristic, palmitoleic acid의 경우는 팔공이 유의적으로 높았다. 두 품종 현미에서 유의적인 차이를 보인 palmitic acid의 경우 백미의 경우에도 식미가 우수한 고품이 팔공보다 높게 나타내었으나 유의적인 차이는 확인되지 않았다. Kim et al. (1996)은 식미가 양호한 쌀의 palmitic acid양이 식미가 낮은 쌀보다 1.1~2.8% 높게 나타났다고 보고하여 지방산 조성 과 식미와의 상관관계의 가능성을 제시하였다.

Table 4-2. Comparison fatty acid composition of total lipid in brown and milled rice

Fatty acid composition	Gopumbyeo		Palgongbyeo	
	brown rice	milled rice	brown rice	milled rice
Lipid content (%)	2.76±0.30	0.89±0.01	2.80±0.14	0.87±0.06
Myristic acid, C _{14:0}	0.25±0.04*	0.38±0.15	0.36±0.01	0.33±0.09
Palmitic acid, C _{16:0}	16.22±0.23*	18.50±1.38	15.50±0.05	16.71±0.49
Palmitoleic acid, C _{16:1}	0.11±0.01*	0.12±0.09	0.15±0.01	0.07±0.06
Stearic acid, C _{18:0}	1.89±0.31	2.19±0.72	1.67±0.11	1.95±0.22
Oleic acid, C _{18:1}	43.78±0.55	36.45±2.04	42.62±0.58	40.13±1.83
Linoleic acid, C _{18:2}	35.18±1.18	40.55±2.12	36.89±0.66	38.91±1.15
Linolenic acid, C _{18:3}	1.72±0.31	1.15±0.13	1.78±0.29	1.16±0.05
Arachidic acid, C _{20:0}	0.44±0.13	0.40±0.09	0.47±0.10	0.41±0.08
Gadoleic acid, C _{20:1}	0.41±0.03	0.26±0.06	0.56±0.13	0.33±0.07
Total saturated fatty acid	18.80	21.47	18.00	19.40
Total unsaturated fatty acid	81.20	78.53	82.00	80.60

Mean value ± SD

* : Significant at $p < 0.05$ between gopumandpalgong by the t-test.

(나) 쌀 배유 비전분(non-starch lipid) 및 전분지질(starch lipid) 함량 조성 비교

고품과 팔공 두 품종의 쌀로써 취반 후 관능검사의 항목 중 윤기와 구수한 냄새 간에 유의적인 차이가 있음이 인정되며, 이들 윤기 및 구수한 냄새의 원인 물질이 쌀의 배유 속 또는 표면에 존재하는 지용성 성분들의 차에 기인할 수 있다는 의미에서, 쌀의 배유에 함유되어 있는 비전분지질(non-starch lipid,유리지질) 함량 및 조성과 배유로부터 분리한 전분입자에 함유되어 있는 전분지질(starch lipid, 결합지질)의 함량 및 조성을 각각 분석 비교하였다(Table 4-3). 두 품종의 쌀들로부터 각각 배유에 함유되어 있는 지방산으로써 myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidic acid, gadoleic acid를 분리할 수 있었다. 유리지질(non-starch lipid)은 조성비가 가장 큰 지방산이 고품의 경우 linoleic acid, 팔공은 oleic acid였으며 전분지질(starch lipid) 조성의 경우 두 품종 모두 palmitic acid였다. 그리고 이들 총 지방산들의 함량 비는 두 품종 간에 각각 차이가 있었으며, 전분입자 내에서 아밀로오스와 복합체를 형성하고 있는 것으로 알려져 있는 전분지질(starch lipid)의 경우 탄소수(C18)가 동일한 지방산의 경우에 고품이 팔공보다 불포화지방산의 함량비가 높은 것을 알 수 있었으며, 총 불포화 지방산의 함량도 역시 고품이 팔공보다 높아, 배유에 함유되어 있는 불포화 지방산의 함량은 식미와 연관성이 있을 가능성을 예상할 수 있었다.

Table 4-3. Comparison fatty acid composition of non-starch and starch lipid in milled rice varieties

Fatty acid composition	Gopumbyeo		Palgongbyeo	
	Non-starch lipid	Starch lipid	Non-starch lipid	Starch lipid
Lipid content (%)	0.89±0.01	0.98±0.01*	0.87±0.06	0.89±0.09
Myristic acid, C _{14:0}	0.38±0.15	1.66±0.47	0.33±0.09	1.98±0.43
Palmitic acid, C _{16:0}	18.50±1.38	38.25±0.55	16.71±0.49	39.75±0.86
Palmitoleic acid, C _{16:1}	0.12±0.09	0.04±0.00	0.07±0.06	0.03±0.02
Stearic acid, C _{18:0}	2.19±0.72	4.48±0.47	1.95±0.22	4.29±0.69
Oleic acid, C _{18:1}	36.45±2.04	20.08±0.12	40.13±1.83	20.50±1.03
Linoleic acid, C _{18:2}	40.55±2.12	33.13±0.40*	38.91±1.15	31.93±0.41
Linolenic acid, C _{18:3}	1.15±0.13	2.02±0.01*	1.16±0.05	1.18±0.35
Arachidic acid, C _{20:0}	0.40±0.09	0.15±0.03	0.41±0.08	0.16±0.03
Gadoleic acid, C _{20:1}	0.26±0.06	0.19±0.04	0.33±0.07	0.18±0.06
Total saturated fatty acid	21.47	44.54	19.40	46.18
Total unsaturated fatty acid	78.53	55.46	80.60	53.82

Mean value ± SD

* : Significant at p<0.05 between gopumandpalgong by the t-test.

(다) Phytosterol(식물성 스테롤류) 조성 비교

취반 밥알의 윤기에 영향을 미치리라 여겨지는 옥타코사놀의 함량은 두 품종 간에 차이가 없었으며 지용성 성분에 해당하는 식물성 스테로이드류들의 함량 조성은 고품과 팔공에서 각각 차이를 나타내고 있었다(Fig. 4-4). 이러한 식물성 스테로이드류들의 함량과 식미와의 연관성에 대해서는 전혀 연구된바 없지만, 식미와 배유조성 지방산들의 불포화도와 연관성이 있을 가능성을 감안하면, 이들 식물성 스테롤류들의 함량 조성비 또한 식미와의 연관성이 있을 것으로 예상할 수 있겠다. 식미가 우수한 고품의 경우, 그 함량 조성이 높은 지용성 성분으로는 스쿠알렌과 사이클로아테놀이었고, 반면 곡류에 함유되어 있는 대표적인 식물성 스테롤류인 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 시토스테롤(Leach et al., 1959)의 함량은 팔공과 비슷한 함량을 보였다.

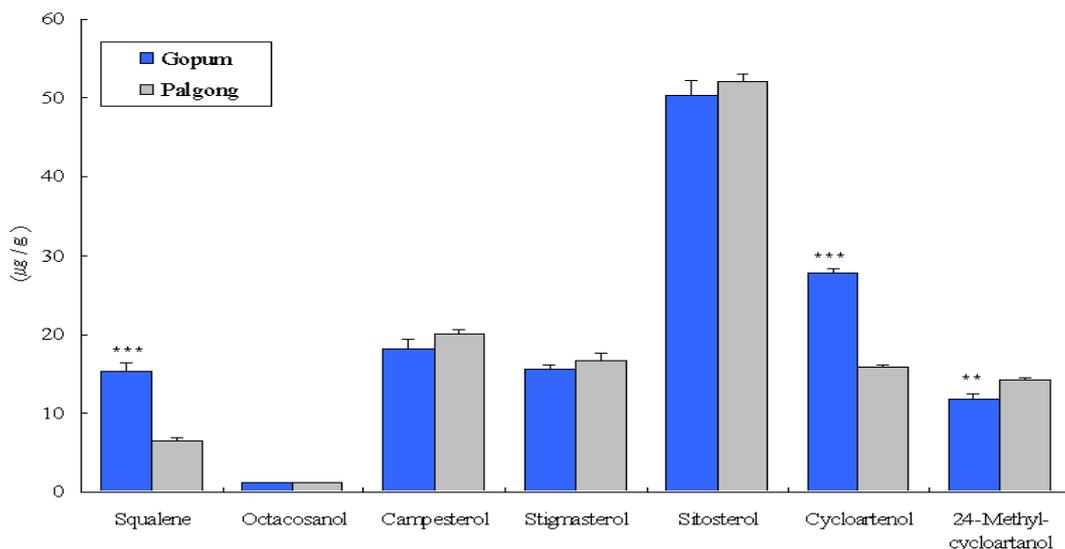


Fig. 4-4. Squalene and phytosterols composition in rice bran lipids.

Results are means of triplicate determinations. **: p<0.01; ***: p<0.001

(라) 아미노산 조성 비교

쌀은 밀이나 옥수수에 비해 lysine, tryptophan, valine, arginine 등의 아미노산 조성이 우수하다. 품종별 쌀에 함유된 구성 아미노산 조성비(mol%)는 aspartic acid, glutamic acid 등이 높게 나타났으며 고품은 Asp (18.92 %) > Glu (18.59 %) > Lys (9.99 %) > Phe (8.92 %) 순위로 높았고 팔공은 Glu (16.71 %) > Asp (12.72 %) > Asn (11.15 %) > Lys(10.26 %) 순위였다. 특히 aspartic acid은 고품이 팔공보다 6.20%, glutamic acid는 1.88% 높게 나타났다. 총 아미노산에 대한 필수아미노산 비율은 팔공(28.42%)이 고품(26.55%)보다 1.87% 높은 비율을 보였으며 필수아미노산 중 쌀의 제 1제한요소인 lysine의 조성비는 거의 비슷한 비율을 나타내었다 (Table 4-4).

Table 4-4. Amino acid composition in milled rice varieties

(Unit: MOL %)

Amino acid	Gopumbyeo	Palgongbyeo	Amino acid	Gopumbyeo	Palgongbyeo
Aspartic acid	18.92	12.72	Proline	2.61	2.90
Glutamic acid	18.59	16.71	Tyrosine	0.87	0.87
Asparagine	8.79	11.15	Valine	1.42	1.46
Serine	4.39	6.22	Methionine	0.69	0.85
Glutamine	5.51	2.69	Cystine	0.78	0.00
Glycine	4.21	5.77	Isoleucine	0.97	0.73
Histidine	1.39	1.73	Leucine	1.32	1.15
Arginine	2.02	3.36	Phenylalanine	8.92	9.69
Threonine	1.01	1.47	Tryptophan	0.84	1.08
Alanine	6.74	9.19	Lysine	9.99	10.26

(마) 비전분성 당 함량 및 조성

고품벼와 팔공벼의 비전분성 다당류의 성분을 분석한 결과는 Table 4-5에 나타내었다. 비전분성 다당류는 rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, allose 순으로 분리되었으며, 주요당은 glucose로서 전체의 약 92%를 구성하고 있었다. 대부분을 차지하는 glucose와 galactose를 제외하고 internal standard인 allose를 기준으로 볼 때 5탄당인 arabinose와 xylose는 고품벼가 각각 11.46%와 1.79%였으며 팔공벼는 각각 4.16%, 1.63%였다. 그 밖의 비전분 다당류인 rhamnose가 고품벼, 팔공벼 각각 4.68%, 2.63%, fucose는 각각 9.07%, 3.31%였으며 ribose는 각각 1.94%, 0.24%를 차지하고 있었다.

Table 4-5. Sugar content of non-starch polysaccharide in varieties

Variety	Sugar	Area (%)
Gopumbyeo	Rhamnose	4.68
	Fucose	9.07
	Ribose	1.94
	Arabinose	11.46
	Xylose	1.79
	Allose (Internal standard)	71.07
Palgongbyeo	Rhamnose	2.63
	Fucose	3.31
	Ribose	0.24
	Arabinose	4.16
	Xylose	1.63
	Allose (Internal standard)	88.03

(바) 호화특성 변이

① 팽윤 특성 비교

취반에 따른 쌀 배유 성분들의 이화학적 특성 중 호화특성은 쌀의 식미특성을 잘 반영하는 지표라 할 수 있다. 이러한 호화특성은 쌀 배유의 주성분인 전분분자 및 전분입자를 둘러싸고 있는 막조성 탄수화물 분자에 물이 첨가되고(수화), 열이 가해짐으로써 나타나는 전분분자의 재배열(gel 망상구조 형성) 결과 나타나는 대표적인 물성의 변화라 할 수 있다. 이러한 의미에서, 우선 쌀 배유 전체를 그대로 분쇄한 쌀가루와 배유로부터 전분입자를 분리하여 제조한 전분 가루를 시료로 이들의 수화특성을 각각 검토하였다. 즉 쌀가루 및 전분 가루를 온도별로 수침하였을 때 팽윤력을 각각 비교한 것이다(Table 4-6, Fig. 4-5). 팽윤력은 용해도, 투명도, 점도와 밀접한 관계를 가지며 전분의 팽윤성질은 입자내 미셀구조의 강도와 성질에 큰 영향을 받는다고 한다. 쌀 배유 전체를 그대로 분쇄한 쌀가루의 경우에는 지용성 성분들이 그대로 존재하고 있음을 의미하는 것이고, 전분가루는 배유 전분입자만을 분획한 것이므로 지용성 성분을 포함한 다른 성분들은 제거된 채, 전분분자 중 아밀로오스와 복합체를 형성하고 있는 starch-lipid의 영향만이 존재할 것이므로, 쌀에 함유되어 있는 지용성 성분들이 수화에 미치는 영향을 비교하는 수단으로써 적절하리라 사료되어 검토해 보았다. 또한 수화를 유도하는 물의 온도를 55℃에서 95℃까지 범위로써 설정한 이유는, 팽화도에 영향을 미치는 요인으로써 아밀로오스와 복합체를 형성하고 있는 starch-lipid의 성분 조성의 변이도 고찰할 수 있으리라는 의미에서였다. 즉, 쌀 전분의 호화온도인 약 70℃ 이상부터는 전분입자가 호화를 시작하기 때문에, 전분분자를 구성하고 있던 아밀로오스 분자의 거동 또한 팽윤에 어떠한 영향을 미치리라 예상되기 때문이다. 수침에 따른 팽화도는 두 품종 모두에서 쌀가루에 비해서 전분가루가 높은 것을 알 수 있다. 그리고 수침 온도가 증가할수록 팽화도 증가의 폭이 큰 것을 알 수 있다. 이는 쌀 곡립의 호화특성 중 초기 단계인 수화과정에 지질성분들이 어떠한 형태로든 관여하고 있음을 시사하는 결과임을 확인할 수 있었다.

쌀 전분은 65℃ 이후의 팽윤력의 증가폭이 컸다. 65℃ 이후에 팽윤력과 용해도가 급격하게 증가하는 현상은 온도의 증가에 따라 전분입자 내부의 결합력이 점진적으로 이완됨을 나타낸다고 볼 수 있다. 또한 두 품종간의 팽윤력의 차이를 보면, 수화 초기 온도 65℃에서 고품 쌀가루 팽윤력이 팔공보다 높았다. 이는 쌀 배유 전분의 결정성에 기인한 것이며 그 외에 쌀가루에 함유된 다른 성분들의 영향에 의한 것으로 보인다. 입자내의 결정성이 클수록 팽윤력은 낮다(Leach et al., 1959)고 하였으며 또한 Tester & Morrison (1990b)은 쌀에 소량 함유된 지방은 아밀로오스와 복합체를 형성하여 전분입자의 팽윤을 저지하며 쌀 단백질은 쌀 배아와 전분입자 사이에 조밀하게 단백질 체로 존재하는데 이들에 의해 팽윤력을 억제한다고 하였다.

Table 4-5. Temperature effects on swelling powers of rice varieties

Temperature (°C)	Swelling power (g/g)			
	Gopumbyeo		Palgongbyeo	
	Rice flours	Rice starches	Rice flours	Rice starches
55	3.58±0.25	3.67±0.21 (0.09↑)	3.44±0.32	3.61±0.39 (0.17↑)
65	6.50±0.32*	8.28±0.11 (1.78↑)	5.65±0.33	8.39±0.14 (2.74↑)
75	8.15±0.48	9.65±0.31*(1.50↑)	8.51±0.43	10.59±0.07 (2.08↑)
85	10.09±0.42	13.46±0.42 (3.37↑)	9.76±0.43	14.70±0.88 (4.94↑)
95	15.31±0.04	17.89±0.74*(2.58↑)	15.01±0.54	19.99±0.90 (4.98↑)

Mean value ± SD.

* : Significant at p<0.05 between gopumbyeo and palgongbyeo.

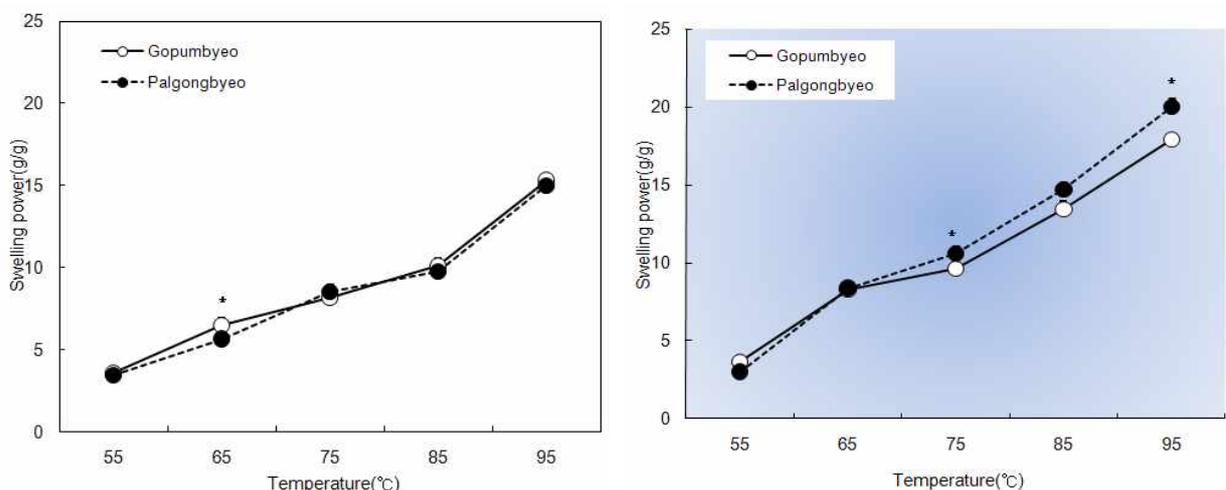


Fig. 4-5. Temperature effects on swelling powers of rice varieties.

② 신속 점도계와 시차주사열량기에 의한 호화 특성

신속점도계(Rapid Visco Analyzer)와 DSC (Differential Scanning Calorimeter)을 이용하여 쌀가루와 전분의 가열에 따른 호화특성을 각각 비교하였다.

Table 4-6. Pasting properties of rice flours and starches

			Gopumbyeo	Palgongbyeo
Rice flours	Pasting Temp.(°C)		69.83***	72.77
		Peak	2708.67**	2622.67
	Viscosity (CP)	Trough	1762.00**	1638.67
		Final	2822.33**	2723.00
		Breakdown	946.67**	984.00
		Setback	113.67	100.33
Rice endosperm starches	DSC characteristics	To	61.34±0.28*	63.11±1.11
		Tp	69.87±1.07*	70.87±0.50
		Tc	73.90±0.82*	75.01±0.98
		ΔH (cal/g)	0.55±0.29*	0.89±0.22

Results are means of triplicate determinations

*, **, *** : significant at $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 by the t-test, respectively

표에서 알 수 있듯이 쌀가루의 경우 호화온도에서 고품과 팔공 두 품종 간에 차이가 커서, 식미가 좋은 고품(69.83°C)이 팔공(72.77°C)보다 호화온도가 낮았고, 점도의 break down 수치가 낮아, 일반적으로 식미에 바람직한 호화특성을 나타내고 있다는 것을 알 수 있다. 고품은 가열 호화되어 팽윤된 후에도 입자가 붕괴되지 않고 어느 정도 입자의 형태를 유지할 수 있음을 유추할 수 있다. 그리고 전분입자의 호화특성을 검토하는 수단인 DSC 분석에 의하면, 전분 가루의 경우에도 물론 고품이 팔공보다 호화온도가 낮고 호화엔탈피도 낮게 나타내었다. 고품과 팔공 두 품종 간에 보이는 호화특성의 변이가 t-검정에서 쌀가루의 경우에는 고도의 유의적인 1% 또는 0.1% 수준에서 의미가 있는 차이임에 비해서 전분 가루의 경우에는 5%의 수준에서 의미가 있는 차이임을 감안해보면, 지용성 물질이 식미에 영향을 미치는 호화특성에도 관여하고 있음을 알 수 있다.

(사) Amylose 쇠장(Chain length) 비교

식미에 영향을 미치리라 예상되는 지질 성분들 중 starch-lipid의 영향에 대한 고찰을 위해서 고품과 팔공 두 품종 전분분자 중 아밀로오스 분자의 포도당 사슬길이 변이를 검토하였다 (Table 4-7). 아밀로오스 분자는 포도당 6분자마다 나선구조를 가지면서 형성되는 소수성 부분에 지질을 함유하는 특성이 있으며 요오드 반응은 전분의 직쇄상 분자의 상대적인 양을 나타내므로 요오드 반응이 높다는 것은 직쇄상 분자가 많다는 것을 의미한다. 고품 및 팔공의 아밀

로오스 함량은 각각 16.53%, 16.82%로서 큰 차이는 없으나 I2-전분 복합체의 최대 흡수파장대가 팔공보다 높았다. 즉, 아밀로오스를 구성하고 있는 포도당 사슬의 길이는 길다는 점을 알 수 있다. 실제로 고품이 팔공보다 아밀로오스 함량 자체는 낮지만 starch-lipid의 함량은 높았다는 점을 설명하는 결과라고도 할 수 있겠다.

Table 4-7. Amylose contents and wavelength in λ_{max} of iodine absorption of rice starches

Variety	Amylose content (%)	Wavelength of maximum absorbance	
		Wavelength (nm)	Optical Density
Gopumbyeo	16.53±0.50	576.0±1.0*	0.32±0.00
Palgongbyeo	16.82±0.00	573.3±0.5	0.31±0.00

Mean value ± SD.

* : significant at $p < 0.05$ by the t-test.

(아) X-선 회절도

X선 회절도의 pattern은 전분의 결정화도를 나타내는 지표로써 전분을 구성하는 아밀로펙틴 분자의 cluster 구조의 결정성을 분석하는데 이용된다. 각 품종 전분 입자의 X-선 회절도에 의한 결정성 및 결정강도를 Fig. 4-6에 나타내었다. Peak가 날카로울수록 결정화도가 크다는 것을 의미하며 고품, 팔공 품종 모두 피크가 회절각도(2θ) 15~16°, 17~18°, 22~23° 근처에서 나타나는 전형적인 A형이었다. Ong & Blanshard(1995)은 결정강도는 피크를 포함하는 면적비와 높은 상관관계를 보여준다고 보고하였는데, 두 전분의 결정강도의 차이는 크지 않음을 알 수 있었다.

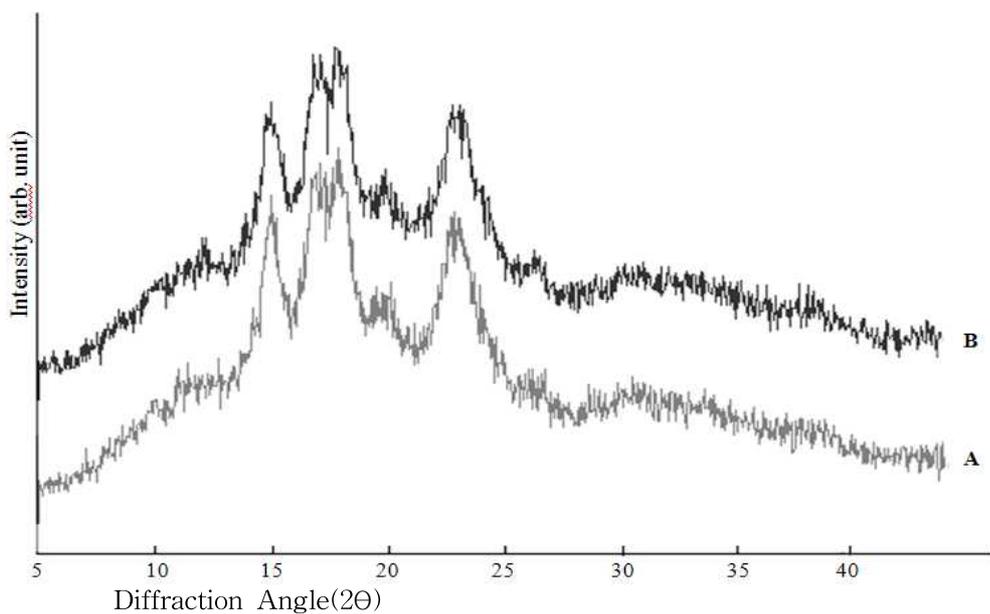


Fig. 4-7. X-ray diffractograms of rice starches. A: Gopumbyeo, B: Palgongbyeo

(자) Glucoamylase에 의한 가수분해도 비교

식미에 차이가 있는 두 품종 결정화도를 유추하는 수단으로써 전분입자의 glucoamylase에 의한 경시적인 가수분해도를 비교하였다(Table 4-8). Glucoamylase는 전분분자의 환원성 말단에서부터 순차적으로 작용하여 최종적으로 glucose 단위까지 가수분해 시키는 exo-type의 효소이다. 실제로 생전분에 glucoamylase를 작용시키면 생전분 입자는 입자의 표면으로부터 넓은 범위에 걸쳐 가수분해가 진행되므로 SEM 사진에서는 전분분자의 표면이 너와집 지붕과 같은 형태로 관찰된다(Zobel et al., 1988). 이는 전분 분자의 표면에 pin hole이 형성되면서 가수분해되고 전분입자를 부수면 계단상의 층상구조가 보이는 endo-type의 효소인 a-amylase와 다른 특성이라는 점에서 전분분자의 미세구조를 유추하는 수단으로 사용되기도 한다(Roy et al., 1984). 즉 glucoamylase의 초기 가수분해도가 높다는 것은 전분입자의 표면으로 환원성 말단의 수가 많이 분포한다는 의미라고 할 수 있다. 팔공의 가수분해율이 고품보다 높은 것으로 보아 전분입자 표면을 구성하는 전분입자의 환원말단의 수가 팔공이 많은 것을 알 수 있었다.

Table 4-8. Degradation of rice starch granules by glucoamylase

Variety	Hydrolysis rate (%)	
	3 hr	7 hr
Gopumbyeo	13.27±0.76*	44.99±2.76
Palgongbyeo	15.76±0.90	46.24±2.04

* significant at 5% level by the T-test value

나. 식미에서 차이를 보이는 7품종 쌀의 배유 성분 특성 검정

(1) 식미특성 변이

본 연구에 사용한 쌀들은 식미에서 차이가 있다고 선발된 7품종의 쌀들로서 Table 4-9에 나타내는 바와 같이 토요 식미기에 의한 식미치에서 차이를 나타내고 있는 7품종들이다. 이들 쌀을 도정하여 취반 후 관능검사를 통하여 밥의 차진정도(조직감)와 전반적인 기호도를 검정하였다. 토요식미측정기기는 단시간에 백미를 취반한 후 전자파를 조사하여 밥의 윤기로부터 식미치를 제시해주며 식미의 객관적인 평가에 이용되고 있다. 측정원리는 쌀의 맛은 주로 호분층(aleurone layer)의 밑 부분인 100 μm의 부분에 분포한다는 가설로부터 밥맛은 밥 표면을 싸고 있는 보수막의 양에 의해서 결정된다는 것으로 전자파를 조사하여 나온 반응 양을 센서로 측정한다. 밥알 표면의 윤기를 내는 보수막의 양은 밥맛과 비례한다. 여기서 보수막이란 밥을 짓는 동안 쌀에서 용출되는 용출물이 농축된 것으로 밥알 표면을 싸고 있는 막이며 특정 전자파에 의해 측정된 보수막의 두께는 식미를 예측하는 지표가 된다. 본 실험에서 삼광은 77.2로 가장 높은 식미 점수를 나타내었으며 고품 > 추청 > 일품 > 팔공 > 삼남 > 도봉 순으로 품종간의 유의적인 차이를 확인할 수 있었다. 또한 이들 품종들으로써 취반 후 윤기, 구수한 맛, 바람직한 조직감의 정도와 전반적인 기호도를 측정된 7점 척도 관능평가에서는 고품이 가장 높은 점수를 나타내었고 삼광, 추청, 일품, 팔공, 삼남, 도봉 순으로 평가되었다. 즉 밥의 관능적인

특성과 기계를 이용한 평가가 거의 일치하는 결과를 얻었다. 그러므로 본 실험에 사용하고 있는 7품종의 쌀들은 배유조성 이화학적 특성과 식미와의 연관성에 대한 검토에 적합한 쌀 품종 들임을 확인할 수 있었다.

Table 4-9. Palatability and sensory evaluation scores of cooked rice cultivars

Variety	Toyo-taste value	Sensory evaluation scores			
		Glossiness	Roasted nutty taste	Cohesiveness	Overall preference
Samgwangbyeo	77.20±1.50 ^g	5.88±0.64 ^d	5.50±0.53 ^e	5.38±0.51 ^d	5.38±0.51 ^d
Gopumbyeo	75.50±0.20 ^f	6.13±0.64 ^d	6.00±0.53 ^e	5.88±0.35 ^d	5.88±0.64 ^d
Chuchungbyeo	73.60±0.50 ^e	5.00±0.53 ^c	4.50±0.75 ^{cd}	4.38±0.74 ^c	4.63±0.51 ^c
Ilpumbyeo	71.90±1.10 ^d	4.88±0.64 ^c	4.63±0.74 ^d	4.75±0.71 ^c	4.63±0.52 ^c
Palgongbyeo	66.03±0.50 ^c	3.50±0.53 ^b	3.88±0.64 ^c	3.50±0.53 ^b	3.38±0.51 ^b
Samnambyeo	63.70±0.60 ^b	3.25±0.70 ^b	3.13±0.64 ^b	3.00±0.53 ^b	3.13±0.35 ^b
Dobongbyeo	54.20±0.00 ^a	1.88±0.64 ^a	1.88±0.64 ^a	2.25±0.70 ^a	2.00±0.53 ^a

Values are means ± standard deviations.

Different letters within the same columns indicate significantly different at p<0.05.

(2) 전분-지질 복합체(Starch-Lipid)조성 지질 성분 변이

쌀 배유 속 전분 지질은 전분 분자 중 아밀로오스와 결합하여 inclusion complex를 형성할 수 있으며 아밀로오스와 결합된 지질이 가열에 따른 용출 및 재결정 형성에의 영향 등에 의해서 전분의 호화 및 노화 특성을 변화시킨다(Eliasson, 1985b; Kaur & Singh, 2000).

식미에 차이가 있는 7 품종 쌀의 전분-지질 복합체를 형성하고 있는 지질 함량 및 지방산 조성을 분석하였다. Table 4-10에서 알 수 있듯이 품종별 지질 함량 및 지방산 조성에는 유의적인 차이가 있었다. 식미가 좋은 품종일수록 전분-지질 복합체를 형성하고 있는 전분지질 함량이 많은 경향이었으며 식미가 우수한 삼광벼(1.13%)가 다른 품종에 비해 유의적으로 높게 나타내었다(p<0.05). 전분-지질 복합체 형성 지방산 조성 분포는 팔미트산 > 리놀레산 > 올레인산 > 스테아린산 > 리놀레인산 등의 순이었고, 식미가 우수한 품종일수록 아밀로오스와 복합체를 형성하고 있는 전분 지질 지방산 조성비에서 리놀레산 및 리놀레인산의 조성비가 높은 경향을 보이고 있었다. 식미가 동일한 쌀이라 하더라도 저장에 따라 식미가 저하된다는 점과 연관지어 이들 전분-지질 복합체 조성 지방산의 영향에 대한 연구도 심도 깊게 다루어져야 할 것으로 사료된다.

(3) 아밀로오스 성분 특성 변이

7 품종 쌀 배유 전분 분획을 알칼리 호화시킨 후 전분-I2복합체 형성에 기인하는 정색반응물의 680 nm에서의 흡광도로부터 표준물질로 얻은 표준곡선의 회귀식을 이용하여 아밀로오스 함량을 구하였다. 또한 500 nm에서부터 700 nm까지의 흡광도 spectrum으로부터 최대흡수파장(λ_{max}) 및 최대흡수파장에서의 흡광도(OD)로부터 아밀로오스 분자의 쇄장 비교를 실시하였다). 전분-I2 복합체의 최대 흡광도를 나타내는 파장의 차이는 아밀로오스 쇄장의 길이를 나타내며 고 여겨지는 사항이고 최대흡광도를 나타내는 파장에서의 흡광도가 높다함은 유사한 쇄장의 아밀로오스 분획이 중첩되어 있다는 것의 반영으로써 쌀 품종 간 배유 전분 조성 아밀로오스의 구조적인 차이를 반영하는 지표로써 사용할 수 있다(Banks et al., 1959; Banks et al., 1971). Table 4-11에 나타내고 있는 바와 같이 7품종 쌀들의 아밀로오스 함량은 품종 간에 차이가 있지만 도봉과 추청을 제외하면 유의적인 차이는 없었다. 도봉이 가장 낮은 아밀로오스 함량을 나타내고 있었으나 식미치 역시 가장 낮아 일반적으로 아밀로오스 함량이 높은 품종일수록 식미가 낮다는 결과(Chinnaswamy & Bhattachary, 1986)과 상이한 결과를 얻었다. 일반적으로 아밀로오스 함량이 높을수록 호화온도가 높고 밥의 질감이 단단하며 찰기가 떨어진다는 보고(Juliano, 1985)들이 많고 실제로 본연구진들도 양질미의 경우 식미치와 아밀로오스 함량과 상관성이 있다는 결론을 보고한 바 있다(Kim et al., 2007). 도봉의 경우 아밀로오스 함량이 낮음에도 불구하고 식미가 낮은 것은 아밀로오스 함량은 낮지만 단단한 호화 gel을 형성하는 전분 분자 구조상의 특징을 가지는 품종인 것으로 예상할 수 있겠다. 쌀 품종 간 전분-I2 복합체가 형성하는 정색반응의 최대흡광도를 나타내는 파장(λ_{max})도 품종 간에 차이가 있었으며 유사한 정도의 아밀로오스 함량을 가지는 경우에는 쇄장의 길이가 짧아질수록 식미는 나빠지는 경향을 보이고 있었다. 이렇듯 아밀로오스 함량 및 쇄장 길이 분포와 식미와의 연관성에 대해서는 보다 심도 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

Table 4-10. Fatty acid compositions of starch lipid in milled rice cultivars

	(Unit: %)						
	Samgwangbyeo	Gopumbyeo	Chuchungbyeo	Ilpumbyeo	Palgongbyeo	Samnambyeo	Dobongbyeo
Lipid content (%)	1.13±0.04b	0.98±0.01a	0.84±0.05a	0.92±0.09a	0.89±0.09a	0.88±0.10a	0.84±0.05a
Myristic acid, C14:0	1.66±0.01a	1.66±0.47a	1.57±0.09a	2.46±0.02b	1.98±0.43a	1.64±0.08a	1.80±0.10a
Palmitic acid, C16:0	42.06±0.08cd	38.25±0.55a	44.32±1.20e	38.29±1.40a	39.75±0.86ab	40.55±2.33bc	43.97±0.25de
Palmitoleic acid, C16:1	0.04±0.00ab	0.04±0.00ab	0.05±0.01bc	0.07±0.01c	0.03±0.01a	0.07±0.01c	0.07±0.00c
Stearic acid, C18:0	3.35±0.12ab	4.48±0.47c	3.85±0.16bc	4.20±0.90bc	4.29±0.69bc	2.94±0.03a	6.64±0.04d
Oleic acid, C18:1	16.05±0.15a	20.08±0.12cd	16.08±0.62a	18.96±0.07bc	20.50±1.03de	18.77±1.34b	21.56±0.15e
Linoleic acid, C18:2	34.77±1.07e	33.13±0.40c	31.66±0.89b	33.41±0.11cd	31.93±0.41b	34.52±0.73de	23.90±0.30a
Linolenic acid, C18:3	1.83±0.71ab	2.02±0.01b	2.25±0.25b	2.34±0.49b	1.18±0.35a	1.23±0.33a	1.67±0.17ab
Arachidic acid, C20:0	0.13±0.00a	0.15±0.03a	0.13±0.00a	0.13±0.03a	0.16±0.03a	0.13±0.01a	0.26±0.01b
Gadoleic acid, C20:1	0.11±0.00ab	0.19±0.04ab	0.09±0.01a	0.14±0.02ab	0.18±0.06ab	0.15±0.02ab	0.13±0.00ab

Data were presented as means standard deviation.

Different letters within the same columns indicate significantly different at $p < 0.05$.

Table 4-11. Amylose contents and wavelength in λ_{max} of iodine absorption of rice starches

Variety	Amylose contents (%)	Wavelength of maximum absorbance	
		Wavelength (nm)	Optical density
Samgwangbyeo	17.40±0.50c	576.0±1.7c	0.33±0.01c
Gopumbyeo	16.53±0.50bc	576.0±1.0c	0.32±0.00bc
Chuchungbyeo	18.85±0.50d	578.0±1.0d	0.34±0.00c
Ilpumbyeo	16.24±0.50b	576.3±0.5cd	0.30±0.01a
Palgongbyeo	16.82±0.00bc	573.3±0.5b	0.31±0.00ab
Samnambyeo	16.53±1.00bc	572.6±1.1b	0.30±0.01a
Dobongbyeo	11.03±0.50a	555.6±0.5a	0.30±0.00a

Values are means ± standard deviations.

Different letters within the same columns indicate significantly different at $p < 0.05$.

(4) 호화특성 변이

(가) 신속점도측정계(RVA)와 시차주사열량기(DSC)에 의한 호화특성

쌀가루와 쌀 배유로 부터 분리한 전분 분획 입자의 가열에 따른 호화특성을 신속점도측정계(RVA)와 시차주사열량계(DSC)를 이용하여 각각 분석하였다. 식미에 차이가 있는 품종 간 쌀가루들의 호화개시온도와 여러 가지 점도 특성은 유의한 차이를 나타내고 있었다(Table 4-12). 품종별 쌀가루의 RVA측정에 의한 호화온도는 68.9°C 부터 82.5°C 까지 유의적인 차이를 나타내었으며 이들 호화온도의 차이가 식미치를 어느 정도 반영하는 것으로 보인다.

7종류 쌀 중 식미가 중간정도에 해당하는 일품이 다른 품종의 쌀들에 비해서 가장 낮은 반면 식미가 가장 나쁜 품종인 도봉은 두드러지게 높은 82.5°C를 나타내었다. 전분 입자 내의 내부 구조가 치밀할수록 가열 시에 느리게 팽윤되어 호화온도가 높게 반영된다고 하였으며 (Ghiashi et al, 1982) 또한, Matveev et al. (2001)은 아밀로펙틴 클러스터 내에 보다 긴 체인이거나 큰 결정구조간의 상호작용에 의해서라고 하였다. 전분입자의 팽윤 상태 및 열이나 전단에 대한 팽윤된 입자의 저항정도를 나타내는 최고점도(P)는 아밀로오스 용출 속도에 영향을 받는데 본 연구에서는 추청과 삼남 품종이 가장 낮은 값을 나타내었고 도봉은 가장 높았다. 최고점도와 최저점도의 차이를 나타내는 강하점도(breakdown)에서도 중간정도의 식미치를 나타내는 일품이 다른 품종에 비해 유의적으로 낮은 반면, 식미치가 낮은 도봉은 높았다. 결국 도봉은 호화되기 어렵고 일단 호화되어 팽윤된 후에도 입자의 붕괴가 쉬워 취반에 따른 식미치가 나쁠 것이라는 예상이 가능한 결과라 할 수 있겠다. 50°C의 냉각점도 및 setback은 전분의 노화 경향을 반영하며 값이 클수록 노화가 쉽다고 할 수 있는데 이는 전분 호화액의 냉각 시 무질서한 상태로 존재하던 아밀로오스 분자들이 서로 재배열되어 분자간의 보다 많은 수소결합을 통해 회합체를 이룸으로써 점도는 증가하게 된다(Leelavathi et al., 1987). 식미가 낮은 품종인 팔공, 삼남, 도봉의 setback은 낮은 경향을 나타내었고 일품은 가장 높게 나타내어 노화가 가장 쉽게 일어난다고 볼 수 있겠다. 또한 Choi et al.(1988)은 쌀 전분의 경우 탈지하면 setback이 증가하여 노화가 더 쉽게 일어난다고 하였다.

Table 4-12. Pasting properties of seven rice flours by rapid visco-analyzer

Variety	Pasting Temp.(°C)	Viscosity				
		Peak	Trough	Final	Breakdown	Setback
Samgwangbyeo	70.23b	2386.33b	1582.33b	2639.00cd	804.00bc	252.67d
Gopumbyeo	69.83b	2708.67c	1762.00cd	2822.33e	946.67e	113.67b
Chuchungbyeo	69.75b	2003.67a	1265.33a	2201.00b	738.33b	197.33c
Ilpumbyeo	68.93a	2632.00c	2131.00e	3178.00f	501.00a	546.00e
Palgongbyeo	72.77c	2622.67c	1638.67bc	2723.00de	984.00e	100.33b
Samnambyeo	72.30c	1993.00a	1164.67a	2056.67a	828.33d	63.67b
Dobongbyeo	82.52d	3146.00d	1833.00d	2540.00c	1313.00f	-606.00a

Values are means \pm standard deviations.

Different letters within the same columns indicate significantly different at $p < 0.05$.

한편, 전분입자의 열에 의한 물리적 상전이 현상의 분석으로부터 호화특성을 설명하는 DSC 측정치(Table 4-13)에 의하면 식미가 다른 7품종들은 품종 간에 유의적인 차이가 있었다. 전분입자의 호화개시 온도는 도봉(75°C)을 제외하면 58~60°C 정도로써 그 차이가 크지 않았으며 호화피크의 온도도 도봉을 제외하면 대체로 64~67°C 근처이고, 호화종료 온도 역시 도봉을 제외하면 75~79°C 로써 그 차이가 크지 않았다. 호화 개시온도는 추청, 일품, 고품이 다른 품종들에 비해서 유의적으로 낮았으며 삼광 < 팔공 < 삼남 < 도봉 순이었다. 이렇게 전분의 호화개시온도가 쌀가루로 측정된 RVA 의 경우보다 낮은 이유 중 하나는 전분의 호화에 관여하는 요인들이 전분입자의 결정성의 차이뿐만 아니라 쌀가루에 함유된 지방, 단백질 등도 영향을 미침으로써 입자내부로의 수분 침투가 용이하지 않아 팽윤과 호화를 억제하기 때문인 것으로 보인다. Yuan et al.(1993)은 아밀로펙틴의 미세구조 차이는 호화특성에 영향을 미치며 호화온도가 높아지는 것은 긴 사슬이 차지하는 비율이 많으면 보다 높은 온도를 필요로 하기 때문에 호화온도는 높아진다고 하였다. 한편, 흡열피크에서의 호화 엔탈피는 호화 상 전이에 필요한 에너지 량으로 2.6 J/g로부터 4.3 J/g까지의 변이를 나타내고 있었으며 도봉이 가장 높아 다른 쌀 품종들에 비해서 전분의 결정성 부분을 용융하는데 더 많은 에너지가 필요함을 알 수 있었다. 전분입자의 결정성이 낮으면 호화개시온도가 낮고 호화열도 작다고 보고(Wada et al., 1999)하였는데 본 실험에서 도봉이 다른 품종에 비해서 결정성이 크다는 것을 재확인할 수 있는 결과이다. Amylose-lipid complex 형성은 발열반응으로 전분의 호화과정 중에 일어나며 생성된 complex는 90~120°C 사이의 높은 온도 범위에서 용융되는데 이 때 흡열되는 enthalpy가 peak로 나타나며 이런 특성은 amylose 정량에 이용되기도 한다(Raphaslides & Karkalas, 1988; Rutschmann & Solms, 1990).

Table 4-13. Gelatinization and endotherm characteristics of rice starch granules

Variety	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔH(J/g)
Samgwangbyeo	58.86±0.10 ^b	64.92±0.15 ^c	74.76±0.06 ^a	2.63±0.18 ^a
Gopumbyeo	58.40±0.33 ^a	65.19±0.10 ^d	76.20±0.73 ^{bc}	3.19±0.10 ^b
Chuchungbyeo	57.95±0.19 ^a	64.31±0.12 ^a	75.22±0.08 ^{ab}	2.82±0.24 ^a
Ipumbyeo	58.15±0.21 ^a	64.65±0.09 ^b	76.66±0.57 ^c	3.23±0.07 ^b
Palgongbyeo	59.92±0.08 ^c	67.07±0.12 ^e	78.67±0.66 ^d	3.35±0.25 ^b
Samnambyeo	60.04±0.38 ^c	67.15±0.06 ^e	78.32±0.99 ^d	3.50±0.21 ^b
Dobongbyeo	75.25±0.26 ^d	79.16±0.16 ^f	90.06±0.24 ^e	4.29±0.14 ^c

Values are means ± standard deviations.

Different letters within the same columns indicate significantly different at p<0.05.

T_o, onset of gelatinization

T_p, peak temperature

T_c, conclusion temperature

ΔH, enthalpy of gelatinization.

(나) 쌀가루 및 전분 가루의 팽윤 양상 비교

쌀가루의 호화특성을 검토하기 위한 또 하나의 방법으로써 품종별 쌀가루 및 전분입자의 온도에 따른 팽윤력의 변화를 비교하여 Table 4-14에 나타내었다. 쌀가루 및 전분입자 모두 온도가 증가함에 따라 팽윤력은 증가하는 양상을 보였으며, 모든 품종에서 쌀가루의 팽윤력이 전분에 비해 낮음을 알 수 있다. 이는 쌀가루 내부에 존재하는 전분 외의 다른 성분인 단백질, 지방 등이 쌀가루의 팽윤력을 억제하기 때문 인 것으로 보인다(Roach & Hosney, 1995; Wang & Seib, 1996). 품종 간 차이가 있었는데 식미특성에서 가장 낮은 값을 보인 도봉의 쌀가루와 전분 팽윤력이 수화초기, 특히 65°C에서 다른 품종에 비해 두드러지게 낮았다. 다른 품종에 비하여 도봉은 전분립 내의 결정성이 크다는 것을 의미하는 것으로 전분 입자 내의 결합력이 팽윤의 양상에 영향을 주어 결합강도가 강한 전분일수록 팽윤력이 나쁘다는 결과(Leach et al., 1959; Tester & Morrison, 1990a; Tester & Morrison, 1990b)와 유사한 결론이라 할 수 있겠다.

Table 4-14.. Temperature effects on swelling powers of rice cultivars

		Temperature(°C)				
		55	65	75	85	95
Flours	Samgwangbyeo	3.39 ^c	6.53 ^d	7.56 ^{ab}	9.76 ^a	15.26 ^{ab}
	Gopumbyeo	3.58 ^c	6.50 ^d	8.15 ^{bc}	10.09 ^{ab}	15.31 ^{ab}
	Chuchungbyeo	3.41 ^c	6.28 ^{cd}	7.30 ^a	9.78 ^a	15.24 ^{ab}
	Ilpumbyeo	3.50 ^c	6.68 ^d	7.52 ^{ab}	9.67 ^a	15.41 ^b
	Palgongbyeo	3.44 ^c	5.65 ^b	8.51 ^c	9.76 ^a	15.01 ^{ab}
	Samnambyeo	3.00 ^b	5.90 ^{bc}	8.08 ^{abc}	10.02 ^{ab}	14.95 ^{ab}
	Dobongbyeo	2.60 ^a	2.91 ^a	7.32 ^a	10.52 ^b	14.65 ^a
	Mean	3.27	5.78	7.78	9.94	15.12
Starches	Samgwangbyeo	4.13 ^{cd}	9.46 ^{cd}	10.65 ^c	16.33 ^c	20.01 ^{bc}
	Gopumbyeo	3.67 ^{bc}	8.28 ^b	9.65 ^b	13.46 ^a	17.89 ^a
	Chuchungbyeo	3.72 ^{bc}	9.90 ^d	11.03 ^c	16.00 ^c	18.84 ^{ab}
	Ilpumbyeo	4.16 ^{cd}	9.96 ^d	10.86 ^c	14.62 ^b	20.74 ^c
	Palgongbyeo	3.61 ^{bc}	8.39 ^b	10.59 ^c	14.70 ^b	19.99 ^{bc}
	Samnambyeo	4.36 ^d	8.89 ^{bc}	10.99 ^c	15.25 ^{bc}	19.15 ^{ab}
	Dobongbyeo	2.77 ^a	2.96 ^a	8.86 ^a	17.98 ^d	19.71 ^{bc}
	Mean	3.77	8.25	10.38	15.48	19.48

Values are the means of three replications.

Different letters within same columns mean significantly different at $p < 0.05$.

(5) 전분 입자의 결정화도

본 연구에서 전분을 구성하는 아밀로오스 분자의 구조적인 특성에 대해서는 전분-I2 복합체가 형성하는 정색반응과 전분-지질 복합체를 조성하는 지방산의 성분특성들에 대해서 검토하였다. 한편, 메품종 쌀 전분분자 중 80 % 이상을 차지하는 아밀로펙틴 분자 또한 취반에 따른 호화특성과의 연관으로 식미에 영향을 미치는 성분이다. 본 연구에서는 이들 아밀로펙틴 분자의 성분특성 변이에 대해서는 검토하지 않았으나 아밀로펙틴 분자의 결정화도의 변이가 식미에 어떠한 영향을 미치고 있을 수도 있다는 의미에서 품종별 쌀 전분입자의 X-선 회절도를 비교 검토하였다(Fig. 4-7). 일반적으로 전분입자의 결정성은 짧은 사슬들이 평형하게 집합체를 이루고 있는 아밀로펙틴의 결정화도에 기인하며 X-선 회절도에 나타난 피크 위치나 높이는 결정강도를 나타내므로 전분입자의 결정형을 검토하는데 널리 활용되고 있다(Hizukuri et al., 1961). 식미에 차이가 있는 7가지 쌀 품종 전분의 회절각도(2θ)는 15.0, 17~18, 22~23에서 강한 피크를 보여 구조가 치밀하고 수분이 적은 구조로 알려져 있는 전형적인 A형(Imberty & Perez 1989). 양상을 나타내고 있었으며, X선 회절도의 피크의 높이가 날카로울수록 결정화도가 큰 것을 의미하는데, 식미가 낮은 품종들일수록 피크의 높이가 높아 결정화도는 큰 경향이 있었다. X선 회절도의 피크를 포함하는 면적비로부터 7품종 쌀의 결정강도의 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았으나 도봉은 다른 시료에 비해 결정강도가 크다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 전분입자의 호화특성 분석의 경우, 호화엔탈피(ΔH)가 크고 식미치가 낮은 품종일수록 전분분자의 결정화도가 높은 경향이 있었다는 결과와도 일치하고 있었다.

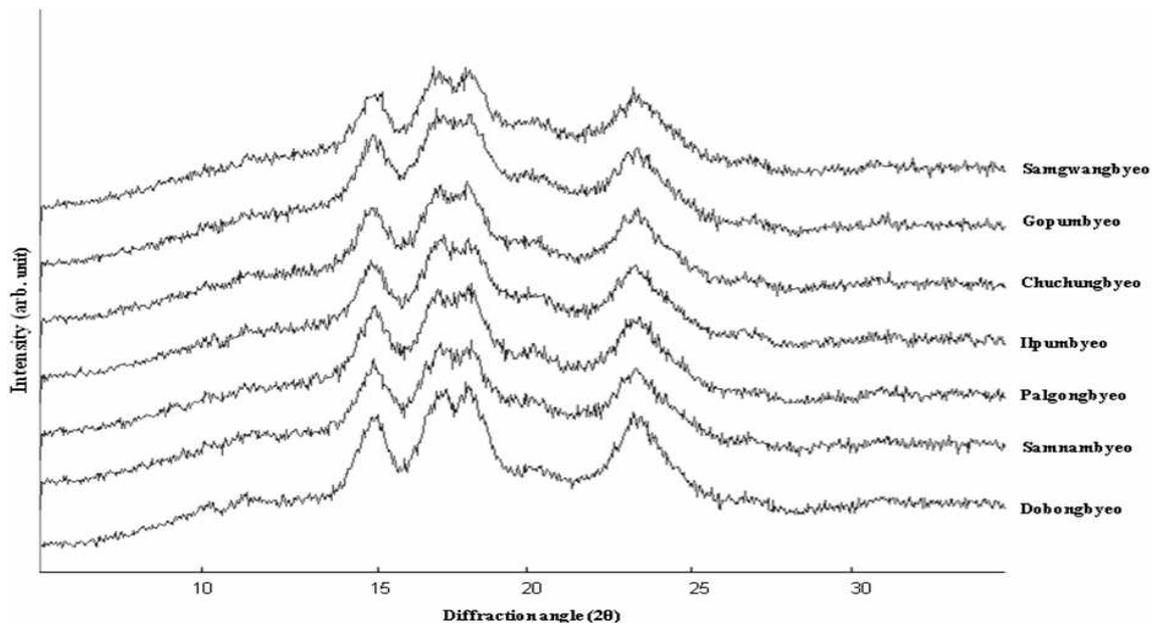


Fig. 4-7. X-Ray diffractograms of starches from rice cultivars.

(6) 비전분 지질(non-starch lipid) 구성 지방산 조성 변이

쌀 배유 내 지방질은 주로 전분립 표면에 붙어있는 비전분지질(non-starch lipid, 유리지질)과 전분립 내에 단단하게 결합되어 있는 전분지질(starch lipid, 결합지질)로 존재한다. 본 실험에 사용한 7종류의 쌀들은 Table 4-15에 제시한 바와 같이 식미치에서 유의적인 차이를 보였으며, 특히 관능검사에서 윤기 및 구수한 냄새에서도 유의적인 차이를 보이고 있어 이는 쌀 배유에 존재하는 지용성 성분에 기인할 수 있다는 관점에서 유리(non-starch) 지방산 조성을 각각 분석 비교하였다. Table 4-15에 나타내고 있는 바와 같이 7품종 쌀들의 총 유리지질의 함량 변이는 0.87%~1.40%의 분포였다. 또한 모든 품종들에서 oleic, linoleic acid의 함량 조성이 높았으며 palmitic acid > stearic acid > linolenic acid > arachidic acid > gadoleic acid > myristic acid의 순이었고 품종에 따라 그 함량 조성비에 차이가 있었다. 이들 구성 지방산 중 포화지방산 및 불포화 지방산의 함량 조성비는 전 품종에 걸쳐서 18.3%~22.2% 및 77.8%~81.7%의 분포를 보이고 있었으며 쌀에 함유된 지방산은 대부분 불포화지방산으로 구성되어 있는 양질의 기름임을 확인할 수 있었다. 품종에 따라 이들의 조성비에도 각각 차이가 있었다.

(7) 지질관련 효소 활성 변이

쌀 함유 지질 성분들의 조리 및 저장 시 영향을 미칠 수 있는 요인으로 생각할 수 있는 지질관련 효소활성의 품종 간 변이를 검토하였다. 지질은 저장 중 lipase에 의해 글리세린과 지방산으로 분해되고 lipoxygenase에 의해 묵은 쌀의 냄새 원인이 된다(Webb, 1985). Lipoxygenase (linoleate : oxygen oxidoreductase, E.C. 1.13.11.12)는 대부분 식물 종실의 저장 조직에 용해된 상태로 존재하고 있으며 산소 존재 시 cis; cis-1, 4-pentadiene system을 함유하는 다불포화 지방산의 과산화 반응을 촉매하여 9 혹은 13-cis, trans-hydroperoxides을 생성하는 효소이다(Hildebrand & Kito, 1984). 이때 생성된 과산화물은 불안정한 화합물로서 분해되어 강한 냄새와 맛을 가지는 화합물을 생성한다. 또한 lipoxygenase는 식품 중의 여러 성분들의 산화에도 관여하여 식물성 식품의 가공 저장시 품질에 영향을 미친다고 한다. Table 19에 나타내는 바와 같이 식미에 따른 효소의 활성은 품종간 유의적인 차이를 보였으며 지질의 가수분해 효소인 lipase 및 지방산 산화 환원 효소인 lipoxygenase 모두 식미치가 낮은 품종일수록 그 활성이 큰 것을 알 수 있었다(Fig. 4-8, Fig. 4-9). 결국 이들 효소의 작용 결과 생성되는 지방산 분해 생성물들은 식미치에 좋지 않은 영향을 주고 있음을 알 수 있다.

Table 4-15. Fatty acid composition of non-starch lipid in milled rice varieties

	Samgwangbyeo	Gopumbyeo	Chuchungbyeo	Ilpumbyeo	Palgongbyeo	Samnambyeo	Dobongbyeo
	(Unit: %)						
Total lipid content	1.11±0.02 ^b	0.89±0.01 ^a	1.06±0.05 ^b	1.25±0.04 ^c	0.87±0.06 ^a	1.40±0.09 ^d	1.24±0.08 ^c
Myristic acid, C _{14:0}	0.28±0.03 ^a	0.38±0.15 ^{ab}	0.27±0.00 ^a	0.25±0.01 ^a	0.33±0.09 ^{ab}	0.30±0.03 ^{ab}	0.41±0.01 ^b
Palmitic acid, C _{16:0}	18.78±0.40 ^c	18.50±1.38 ^c	18.21±0.68 ^{bc}	16.02±0.48 ^a	16.70±0.49 ^a	17.04±0.57 ^{ab}	18.47±0.02 ^c
Palmitoleic acid, C _{16:1}	0.05±0.04 ^{ab}	0.12±0.09 ^b	0.02±0.00 ^a	0.02±0.00 ^a	0.07±0.06 ^{ab}	0.02±0.00 ^a	0.10±0.03 ^{ab}
Stearic acid, C _{18:0}	1.56±0.02 ^a	2.19±0.72 ^b	1.62±0.01 ^a	1.47±0.00 ^a	1.95±0.22 ^{ab}	1.43±0.05 ^a	2.73±0.04 ^c
Oleic acid, C _{18:1}	38.83±0.20 ^b	36.45±2.04 ^a	38.73±0.33 ^b	43.42±1.29 ^c	40.13±1.83 ^b	40.67±0.11 ^b	39.12±0.12 ^b
Linoleic acid, C _{18:2}	38.58±0.50 ^{abc}	40.55±2.12 ^d	39.43±0.38 ^{cd}	36.77±0.79 ^a	38.91±1.15 ^{bcd}	38.53±0.49 ^{abc}	37.44±0.16 ^{ab}
Linolenic acid, C _{18:3}	1.18±0.02 ^d	1.15±0.13 ^d	0.96±0.02 ^{ab}	1.03±0.01 ^{bc}	1.16±0.05 ^d	1.11±0.00 ^{cd}	0.90±0.02 ^a
Arachidic acid, C _{20:0}	0.48±0.06 ^{ab}	0.40±0.09 ^a	0.46±0.00 ^a	0.57±0.00 ^{bc}	0.41±0.08 ^a	0.46±0.03 ^a	0.58±0.00 ^c
Gadoleic acid, C _{20:1}	0.26±0.11 ^a	0.26±0.06 ^a	0.30±0.01 ^a	0.45±0.01 ^b	0.34±0.07 ^a	0.44±0.00 ^b	0.25±0.02 ^a
Total saturated fatty acid	21.10±0.36 ^{cd}	21.47±2.16 ^d	20.56±0.69 ^{bcd}	18.31±0.47 ^a	19.39±0.73 ^{abc}	19.23±0.61 ^{ab}	22.19±0.07 ^d
Total unsaturated fatty acid	78.90±0.36 ^{ab}	78.53±2.15 ^a	79.44±0.69 ^{abc}	81.69±0.47 ^d	80.61±0.73 ^{bcd}	80.77±0.60 ^{cd}	77.81±0.07 ^a

Data were presented as means standard deviation.

Different letters within the same columns indicate significantly different at p<0.05.

Table 4-16. Lipase and lipoxygenase activity of rice varieties.

Variety	Lipase activity (unit/min)	Lipoxygenase activity (uint/mg)
Samgwangbyeo	0.63±0.08 ^a	37.30±0.80 ^{ab}
Gopumbyeo	0.79±0.05 ^{ab}	36.41±0.87 ^a
Chuchungbyeo	0.71±0.03 ^a	39.35±1.38 ^{bc}
Ilpumbyeo	1.25±0.10 ^e	45.46±1.96 ^d
Palgongbyeo	0.99±0.11 ^{cd}	37.67±1.01 ^{ab}
Samnambyeo	1.12±0.02 ^{de}	41.08±2.01 ^c
Dobongbyeo	0.92±0.06 ^{bc}	52.47±2.04 ^e

Results are means of triplicate determinations

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

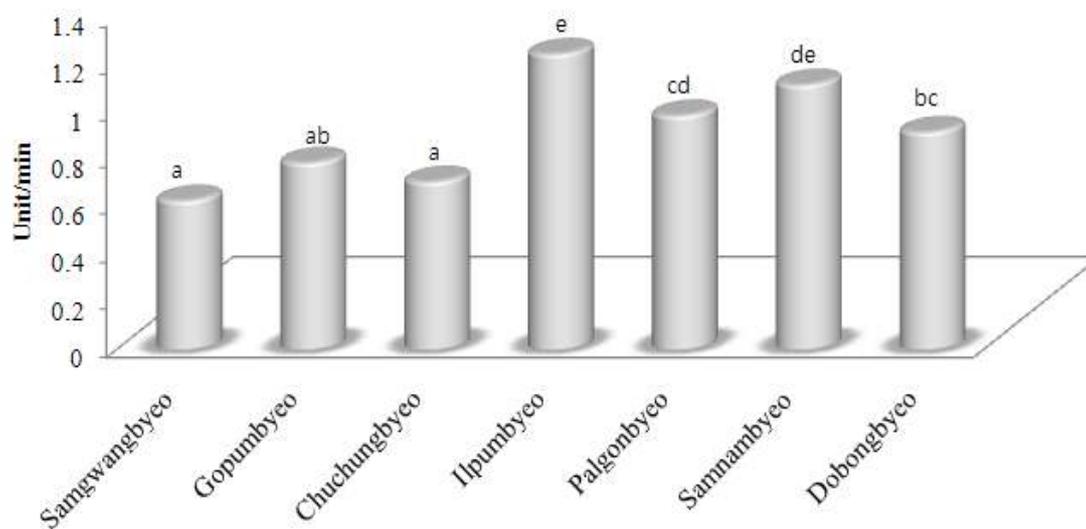


Fig. 4-9 . Hydrolytic activity of rice bran lipase.

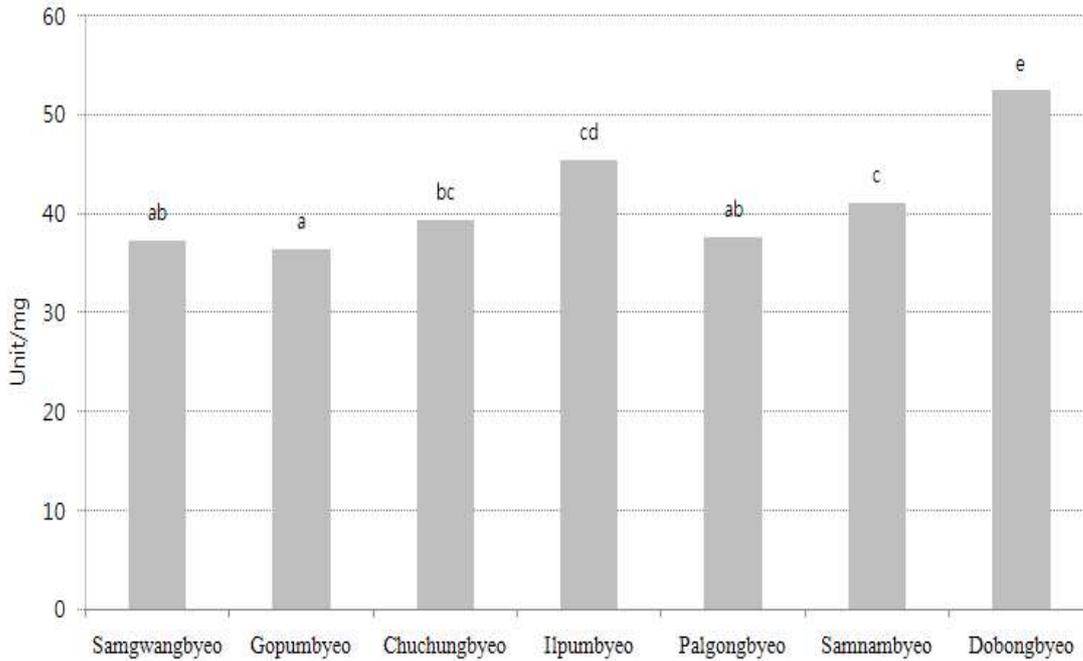


Fig. 4-10. Lipoxigenase activity of rice varieties at pH 7.0.

(8) 식물성 스테롤 함량 조성 변이

Phytosterols은 생체 내 LDL-cholesterol 함량을 감소시키는 등 유익한 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 쌀에는 다른 곡류 유래 식물성 sterol에 거의 함유되어 있지 않은 cycloartenol과 24-methylcycloartenol이라는 특이한 sterol을 함유하고 있다(Piironen et al., 2000). 쌀에 함유되어 있는 식물성 스테로이드류들의 함량과 식미와의 연관성에 대해서는 전혀 연구된바 없지만 식미와 배유조성 지방산들의 불포화도와 연관성이 있을 가능성을 감안하면 이들 식물성 스테롤류들의 함량 조성비 또한 식미와의 연관성이 있을 것으로 예상할 수 있겠다. Gas chromatography를 통해 분석한(Fig. 16) 식미가 우수한 2 품종의 경우 그 함량 조성이 높은 식물성 스테롤류로는 squalene과 cycloartenol이었고 반면 곡류에 함유되어 있는 대표적인 식물성 스테롤류인 campesterol, stigmasterol, sitosterol 등의 함량은 식미에 상관없이 함량을 보이고 있었다(Yoon et al., 2008). 식미에 차이가 있는 7품종 쌀들의 경우에도 squalene의 함량은 식미치가 높은 고품, 추청, 일품 등에서 높은 함량 분포를 보이고 있었으며 식미치가 낮은 도봉 품종이 그 함량이 가장 낮았고 역시 식미치가 낮은 팔공, 삼남 등에는 함량비가 낮음을 알 수 있다. 그러나 식미치 및 관능평가 상의 윤기 및 구수한 냄새에 대한 수치가 높게 나타났던 삼광의 squalene 함량 조성은 오히려 낮았다. 이밖에 식물성 스테롤류의 함량 조성도 쌀 품종에 따라 차이는 있지만 이들 차이와 식미치 또는 취반 윤기와의 상관성은 거의 없는 듯 하였다(Table 4-17).

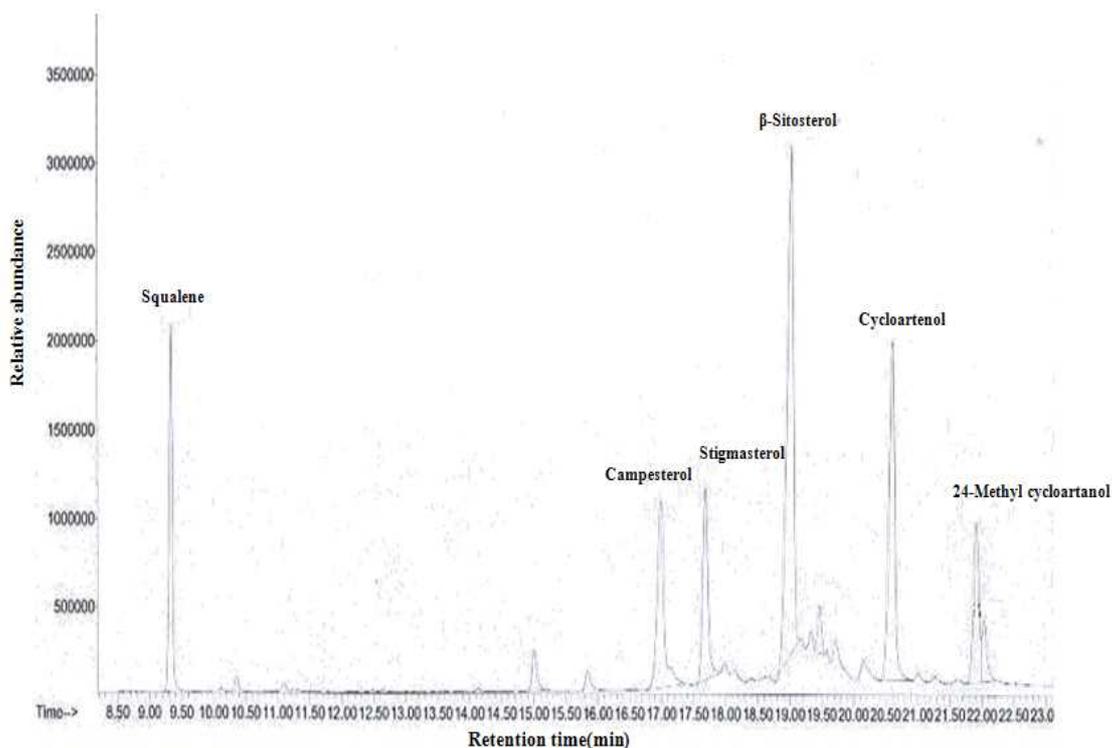


Fig. 4-11. GC-Mass detection of squalene and phytosterols of brown rice oil.

Table 4-17. Phytosterols and squalene composition in rice varieties

($\mu\text{g/g}$ rice)

Variety	Squalene	Phytosterol				
		Campesterol	Stigmasterol	Sitosterol	Cycloartenol	24-Methyl-cycloartanol
Samgwangbyeo	6.82 \pm 0.50 ^b	18.97 \pm 0.60 ^{ab}	15.14 \pm 0.56 ^a	58.19 \pm 1.51 ^b	21.48 \pm 0.37 ^c	13.38 \pm 0.37 ^b
Gopumbyeo	15.28 \pm 1.11 ^e	18.15 \pm 1.29 ^a	15.56 \pm 0.60 ^{ab}	50.36 \pm 1.75 ^a	27.82 \pm 0.55 ^e	11.80 \pm 0.66 ^a
Chuchungbyeo	11.12 \pm 0.19 ^d	28.09 \pm 0.93 ^e	18.63 \pm 0.93 ^c	76.19 \pm 1.93 ^d	28.62 \pm 1.02 ^e	15.77 \pm 0.59 ^d
Ilpumbyeo	15.88 \pm 0.32 ^e	26.07 \pm 0.66 ^d	22.40 \pm 0.13 ^d	65.45 \pm 0.83 ^c	36.99 \pm 0.37 ^f	16.35 \pm 0.34 ^d
Palgongbyeo	6.50 \pm 0.29 ^b	20.07 \pm 0.47 ^b	16.64 \pm 1.03 ^b	52.00 \pm 1.00 ^a	15.77 \pm 0.34 ^b	14.31 \pm 0.28 ^c
Samnambyeo	8.98 \pm 0.48 ^c	21.79 \pm 0.25 ^c	16.00 \pm 0.46 ^{ab}	49.37 \pm 1.21 ^a	23.59 \pm 1.36 ^d	12.73 \pm 0.51 ^b
Dobongbyeo	4.99 \pm 0.07 ^a	23.04 \pm 0.18 ^c	18.87 \pm 0.29 ^c	51.63 \pm 1.33 ^a	14.47 \pm 0.48 ^a	19.32 \pm 0.12 ^e

Results are means of triplicate determinations

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

(9) 아미노산 조성 변이

7품종 쌀의 아미노산 함량 및 조성 변이를 Table 4-18에 나타내었다. 총 아미노산의 함량이 품종 간에 차이를 나타내고 있으며, 이러한 함량 변이가 질소지수로부터 환산한 단백질 함량 변이 보다 크기 때문에 식미에 영향을 미치는 요인으로는 비 단백질 질소 화합물의 영향도 관여하리라 생각 할 수 있겠다. Aspartic acid, glutamic acid가 전체 아미노산 조성의 각각 13.24~23.33%, 15.34~24.07%로 가장 많은 비율을 차지하였다. 식미와 관련하여 맛있는 쌀일수록 glutamic acid, aspartic acid, arginine의 함량이 많고 맛있는 쌀일수록 threonine, proline 함량이 많다고 한다(Matuzaki et al., 1992). 그러나 본 연구 결과에 의하면 glutamic acid 함량이 높은 품종들이 식미치가 높은 경향이 있는 것 같다. 또한 threonine, proline 보다는 오히려 histidine, valine, tryptophan의 함량이 높을수록 식미치는 낮은 경향이 있음을 알 수 있었다.

(10) 식미와 배유성분 특성간의 상관성

식미치는 취반 밥의 윤기, 구수한 냄새, 전반적인 밥의 기호도 등에는 정의 상관성을 보이고 있었으며 배유 구성 성분 중 글리신, 히스티딘, 발린, 트립토판 등의 아미노산 함량과는 부의 상관성을, 그리고 지질 산화 환원 효소인 lipoxygenase의 활성과는 부의 상관성을 나타내고 있었다. 또한 취반 밥의 윤기 및 구수한 냄새를 제공 할 수 있는 지질 성분의 특성에 관여 할 가능성 때문에 검토했던 지질 가수분해 효소인 lipase 활성은 윤기 및 냄새와는 상관성이 없었고 oleic, gadoleic acid 함량과는 정의 상관성을, palmitic acid와는 부의 상관성을 나타내고 있었다. 한편 지질과산화 효소인 lipoxygenase의 활성은 취반 밥의 구수한 냄새와는 부의 상관성을 그리고 비전분 지질 구성 지방산 중에서 linoleic acid와 linolenic acid 함량과는 부의 상관성을, arachidic acid의 함량과는 정의 상관성을 나타내고 있었다. 또한 lipoxygenase 활성은 배유에 함유되어 있는 식물성 스테로이드 화합물인 24-Methylcycloartenol 함량과는 정의 상관성을 나타내고 있었다(Table 4-19).

Table 4-18. Amino acid composition of milled rice varieties

Amino acid	(ng/mg)						
	Samgwang byeo	Gopum byeo	Chuchung byeo	Ipum byeo	Palgong byeo	Samnam byeo	Dobong byeo
Aspartic acid	64.56 (14.84 ^a) [†]	79.82 (15.31 ^b)	183.95 (22.76 ^d)	144.31 (23.33 ^d)	69.29 (13.36 ^a)	103.22 (18.28 ^c)	71.44 (13.24 ^a)
Glutamic acid	77.19 (17.74 ^b)	125.53 (24.07 ^e)	183.95 (22.76 ^d)	144.31 (23.33 ^d)	99.50 (19.18 ^c)	103.22 (18.28 ^{bc})	82.77 (15.34 ^a)
Arginine	20.69 (4.75 ^c)	18.83 (3.61 ^a)	29.53 (3.65 ^a)	29.91 (4.83 ^c)	22.23 (4.29 ^b)	30.38 (5.38 ^d)	27.13 (5.03 ^{cd})
Asparagine	62.14 (14.28 ^b)	70.04 (13.43 ^b)	144.32 (17.86 ^d)	84.83 (13.71 ^b)	81.50 (15.71 ^c)	92.03 (16.30 ^c)	67.99 (12.60 ^a)
Serine	13.12 (3.01 ^b)	16.70 (3.20 ^c)	25.69 (3.18 ^c)	12.60 (2.04 ^a)	18.62 (3.59 ^d)	18.62 (3.30 ^c)	22.11 (4.10 ^e)
Glutamine	3.11 (0.71 ^a)	17.44 (3.34 ^d)	19.38 (2.40 ^f)	5.63 (0.91 ^a)	28.50 (5.49 ^e)	4.46 (0.79 ^a)	8.95 (1.66 ^b)
Glycine	11.88 (2.73 ^{cd})	9.78 (1.88 ^{ab})	12.21 (1.51 ^a)	9.61 (1.55 ^a)	10.63 (2.05 ^b)	13.29 (2.35 ^{bc})	16.82 (3.12 ^d)
Histidine	6.50 (1.49 ^d)	5.48 (1.05 ^{ab})	7.32 (0.91 ^a)	7.76 (1.25 ^{bc})	5.85 (1.13 ^b)	8.03 (1.42 ^{cd})	11.17 (2.07 ^e)
Alanine	24.19 (5.56 ^b)	19.33 (3.71 ^{ab})	33.28 (4.12 ^{ab})	24.07 (3.89 ^{ab})	16.04 (3.09 ^a)	31.42 (5.56 ^b)	51.66 (9.57 ^c)
Tyrosine	8.19 (1.88 ^c)	4.95 (0.95 ^a)	8.78 (1.09 ^b)	6.68 (1.08 ^b)	5.86 (1.13 ^{ab})	8.82 (1.55 ^{bc})	10.93 (2.03 ^c)
Valine	5.16 (1.19 ^b)	4.53 (0.87 ^a)	7.33 (0.91 ^a)	5.96 (0.96 ^a)	5.87 (1.13 ^b)	6.58 (1.17 ^b)	9.56 (1.77 ^c)
Methionine	1.97 (0.45 ^{ab})	2.12 (0.41 ^{ab})	2.97 (0.37 ^{ab})	1.74 (0.28 ^a)	2.20 (0.42 ^{ab})	2.75 (0.49 ^b)	2.79 (0.52 ^b)
Cystine	0.35 (0.08 ^a)	0.44 (0.08 ^a)	0.43 (0.05 ^a)	0.23 (0.04 ^a)	0.55 (0.11 ^a)	0.23 (0.04 ^a)	0.47 (0.09 ^a)
Isoleucine	3.16 (0.73 ^{cd})	2.90 (0.56 ^{abc})	3.89 (0.48 ^{ab})	2.79 (0.45 ^a)	2.60 (0.50 ^{ab})	3.66 (0.65 ^{bc})	4.95 (0.92 ^d)
Leucine	3.36 (0.77 ^{ab})	3.20 (0.61 ^a)	4.32 (0.53 ^a)	3.24 (0.52 ^a)	3.39 (0.65 ^a)	3.73 (0.66 ^a)	5.25 (0.97 ^b)
Phenylalanine	6.53 (1.50 ^a)	5.58 (1.07 ^a)	6.84 (0.85 ^a)	5.50 (0.89 ^a)	5.80 (1.12 ^a)	6.11 (1.08 ^a)	7.79 (1.44 ^a)
Tryptophan	9.35 (2.15 ^{ab})	12.32 (2.36 ^{ab})	10.26 (1.27 ^a)	9.45 (1.53 ^a)	14.00 (2.70 ^b)	10.83 (1.92 ^{ab})	20.70 (3.84 ^c)
Lysine	80.95 (18.60 ^d)	82.11 (15.75 ^b)	81.43 (10.08 ^a)	83.04 (13.42 ^b)	89.07 (17.17 ^c)	78.12 (13.83 ^b)	76.93 (14.26 ^b)
Threonine	20.92 (4.81 ^a)	25.34 (4.86 ^a)	24.53 (3.04 ^a)	24.06 (3.89 ^a)	23.68 (4.56 ^a)	25.81 (4.57 ^a)	25.06 (4.64 ^a)
Proline	11.85 (2.72 ^{cd})	15.03 (2.88 ^d)	17.76 (2.20 ^{ab})	12.95 (2.09 ^a)	13.60 (2.62 ^{cd})	13.36 (2.37 ^b)	15.09 (2.80 ^{cd})
Total	435.17 (100)	521.47 (100)	808.17 (100)	618.67 (100)	518.78 (100)	564.67 (100)	539.56 (100)

[†] MOL %

The different letters within same columns mean significantly different at $p < 0.05$.

Table 4-19. Correlation coefficients and relevant characters of rice varieties

Relevant characters	Correlation coefficient	
Palatability score	Glossiness	0.98**
	Roasted nutty taste	0.97**
	Overall preference	0.97**
	Glycine	-0.78*
	Histidine	-0.79*
	Valine	-0.81*
	Tryptophan	-0.83*
	Lipoxygenase	-0.76*
Lipase activity	Palmitic acid	-0.89**
	Oleic acid	0.81*
	Gadoleic acid	0.85*
Lipoxygenase activity	Roasted nutty taste	-0.76*
	Linoleic acid	-0.76*
	Linolenic acid	-0.80*
	Arachidic acid	0.88**
	24-Methylcycloartenol	0.87*
	Alanine	0.82*
	Valine	0.83*

*,** : Significant at 5% and 1% level, respectively.

다. 식미에서 차이를 보이는 12 품종 쌀 배유 성분 특성 검정

(1) 취반 식미 특성

본 실험에 사용한 쌀들은 식미에서 차이가 있다고 선발된 12품종의 쌀들로 토요식미계와 관능검사를 통하여 식미특성을 검정하였다. 일본에서 개발된 토요식미기기는 밥을 짓는 동안 쌀의 외층에 분포하는 당질 및 유리아미노산이 용출되어 밥알 표면에 만들어진 보수막에 전자파를 조사하여 흡수되거나 반사되어진 전자파를 센서로 측정하여 수치로 나타낸 것으로 보수막의 양은 밥맛과 정의 상관관계가 있다고 보고하고 있다(竹生新治郎, 1995). 또한 밥에 윤기가 많을수록 밥맛이 좋다는 원리에 근거하여 밥의 윤기에 따른 식미치를 제공해주며 어느 정도 활용성이 있는 것으로 알려져 있다. Table 4-20에 나타내는 바와 같이 토요식미기기에 의한 식미치(Toyo-value)의 결과는 고시히까리가 가장 높은 값(78.1)은 나타내었고 삼광(77.2) > 고품(75.5) > 추청(73.6) > 화성(73.5) > 동진(72.6) > 일품(71.9) > 화청(71.1) > 팔공(66.0) > 삼남(63.7) > 신금오(62.4) > 도봉(54.2)의 순으로 품종간의 유의적인 차이를 보였다. 또한 취반 후 식미치를 반영한다고 볼 수 있는 전반적인 기호도를 비롯한 윤기, 구수한 맛, 조직감의 관능검사 7점 척도 평가 결과에서는 높은 식미치를 가진 고시히까리가 전체 항목에서 가장 높은 값을 나타내었다. 중간정도의 식미치를 보인 추청, 화성, 동진, 일품, 화성 품종간의 비교에서는 윤기 항목에서 동진, 구수한맛, 조직감. 전반적인 기호도에서는 화성이 다른 품종에 비해 높았다. 식미치가 낮은 품종 계열인 팔공, 삼남, 신금오, 동진 품종에서는 팔공이 높은 점수를, 식미치가 가장 낮은 도봉이 관능검사 식미검정에서도 가장 낮은 값을 나타내었다.

(2) 취반미의 기계적 물성

취반 시 팽윤 및 전분립 붕괴에 따라 열수 가용성 물질의 용출로 인하여 경도가 감소하고

끈기는 증가되는 등 물성의 변화가 일어난다. 즉, 취반시 온도상승에 따라 배유부로 수분과 열이 스며들면서 전분립이 느슨해지기 시작하고 호화되며 온도가 더 상승하면 팽윤되어 붕괴되기 시작한다. 밥맛은 쌀의 입체적 구조 및 물리, 화학적 특성에 의해 좌우되며 밥의 찰기와 씹었을 때 부드러움 탄력성은 쌀알의 전분 구조와 단백질, 지방 등 여러 가지 구성성분의 입체적 분포에 의해서 좌우되며 찰기, 탄력성, 경도 등 씹히는 질감을 객관적으로 평가하기 위해 텍스처 분석기를 이용하여 측정하였으며 그 결과는 Table 4-21에 나타내었다. 경도(hardness)와 씹힘성(chewiness)은 쌀밥의 일정 변형을 일으키는데 필요한 힘의 크기를 나타내며 점성을 표현하는 응집성(cohesiveness)과 밥알의 형태 유지 즉, 복원 정도를 판단하는 탄성(springiness)은 쌀밥을 형성하는 내부 결합력의 크기를 나타내며 쌀밥 표면이 접촉부위에 달라붙는 힘을 극복하는데 필요한 일의 양으로서 부착성(adhesiveness)을 조사하였다.

Table 4-20. Palatability and sensory evaluation scores of cooked rice cultivars

Variety	Toyo-taste value	Sensory evaluation scores			
		Glossiness	Roasted nutty taste	Cohesiveness	Overall preference
Koshihikari	78.13±0.68 ^h	7.00±0.00 ^g	6.75±0.46 ^h	6.50±0.53 ^j	7.00±0.00 ^h
Samgwangbyeo	77.20±1.50 ^g	5.88±0.64 ^f	5.50±0.53 ^{fg}	5.38±0.51 ^{hi}	5.38±0.51 ^f
Gopumbyeo	75.50±0.20 ^f	6.13±0.64 ^f	6.00±0.53 ^g	5.88±0.35 ⁱ	5.88±0.64 ^g
Chuchungbyeo	73.60±0.50 ^e	5.00±0.53 ^e	4.50±0.75 ^{cde}	4.38±0.74 ^{ef}	4.63±0.51 ^e
Hwaseongbyeo	73.50±0.50 ^f	5.00±0.76 ^e	5.13±0.64 ^{ef}	5.13±0.64 ^{gh}	5.13±0.35 ^f
Dongjinbyeo	72.60±0.70 ^{ef}	6.00±0.76 ^f	4.50±0.53 ^{cde}	4.63±0.74 ^{fg}	4.50±0.53 ^{de}
Ilpumbyeo	71.90±1.10 ^d	4.88±0.64 ^{de}	4.63±0.74 ^{de}	4.75±0.71 ^{fg}	4.63±0.52 ^e
Hwacheongbyeo	71.13±0.86 ^d	4.25±0.88 ^d	4.25±0.46 ^{cd}	4.00±0.00 ^{de}	4.13±0.35 ^d
Palgongbyeo	66.03±0.50 ^c	3.50±0.53 ^c	3.88±0.64 ^c	3.50±0.53 ^{cd}	3.38±0.51 ^c
Samnambyeo	63.70±0.60 ^b	3.25±0.70 ^{bc}	3.13±0.64 ^b	3.00±0.53 ^{bc}	3.13±0.35 ^{bc}
Singeumbyeo	62.43±1.19 ^b	2.63±0.92 ^b	3.00±0.00 ^b	2.88±0.35 ^b	2.88±0.35 ^b
Dobongbyeo	54.20±0.00 ^a	1.88±0.64 ^a	1.88±0.64 ^a	2.25±0.70 ^a	2.00±0.53 ^a

Data were presented as means standard deviation.

Different letters within the same columns indicate significantly different at $p < 0.05$.

식미가 우수한 고시히카리, 삼광, 고품 품종의 경우 경도(hardness) 및 부착성(adhesiveness)은 각각 1507~1901, -149~-118로 경도는 고품이, 부착성은 삼광이 높은 값을 나타내어 식미치는 높으나 단단한 조직감을 가지고 있음을 알 수 있었다. 검성(gumminess) 및 씹힘성(chewiness)은 고품이 각각 831, 483로서 높은 값을 나타내었다. 중간정도의 식미치를 나타낸 추청, 화성, 동진, 일품, 화청 품종의 경도(hardness)는 1627~1976의 범위로 화성이 가장 높게 나타내었고 부착성(adhesiveness)은 추청 품종이, 응집성(cohesiveness), 검성(gumminess), 씹힘성(chewiness)은 화성이 각각 0.47, 899, 553로서 가장 높은 값을 보였다.

식미가 낮은 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 품종은 경도(hardness), 씹힘성(chewiness)이 고식미치나 중간 식미치를 나타낸 품종들에 비해 각각 1321~1615, 286~389 범위로 낮은 경향을 보였다.

Table 4-21. Texture properties of cooked rice by using Texture Analyzer

Variety	Hardness (g)	Adhesive ness	Springi ness	Cohesive ness	Gummi ness	Chewi ness
Koshihikari	1507.74 ^b	-147.92 ^{bc}	0.68 ^f	0.45 ^{de}	666.42 ^c	436.57 ^e
Samgwangbyeo	1802.79 ^d	-118.75 ^f	0.49 ^{ab}	0.41 ^{ab}	739.15 ^e	355.53 ^{bc}
Gopumbyeo	1901.39 ^e	-149.27 ^{bc}	0.58 ^{cde}	0.43 ^{bc}	831.70 ^g	483.22 ^f
Chuchungbyeo	1776.93 ^d	-130.59 ^{ef}	0.56 ^{cd}	0.44 ^{bcd}	781.42 ^f	432.68 ^e
Hwaseongbyeo	1976.80 ^f	-165.88 ^a	0.62 ^e	0.47 ^e	899.92 ^h	553.04 ^g
Dongjinbyeo	1627.73 ^c	-145.84 ^{bcd}	0.60 ^{de}	0.44 ^{bcd}	685.76 ^{cd}	411.23 ^{de}
Ilpumbyeo	1649.16 ^c	-140.56 ^{cde}	0.53 ^{bc}	0.43 ^{bc}	703.69 ^d	378.05 ^{cd}
Hwacheongbyeo	1828.41 ^d	-156.86 ^{ab}	0.54 ^{bc}	0.40 ^a	748.94 ^e	390.85 ^d
Palgongbyeo	1594.52 ^c	-132.78 ^{def}	0.58 ^{cde}	0.42 ^{abc}	679.15 ^{cd}	389.83 ^d
Samnambyeo	1589.90 ^c	-97.96 ^g	0.46 ^a	0.40 ^a	633.71 ^b	286.19 ^a
Singeumbyeo	1615.56 ^c	-156.84 ^{ab}	0.55 ^{cd}	0.40 ^a	638.32 ^b	337.96 ^b
Dobongbyeo	1321.34 ^a	-147.13 ^{bcd}	0.61 ^e	0.43 ^{bc}	568.05 ^a	341.27 ^b

Data were presented as means standard deviation.

Different letters within the same columns indicate significantly different at $p < 0.05$.

(3) 쌀 배유 함유 지용성 성분 특성

(가) 비전분 지질(Non-starch lipid) 함량 및 지방산 조성

쌀의 지방 함량은 적으나 쌀의 이화학적 특성에 영향을 미치므로 식미가 다른 12품종 쌀들의 비전분 유리지질 함량 및 지방산 조성을 분석하여 식미와의 관련성을 살펴보았다. 지방 함량은 4.80~14.03 mg으로 품종간 유의적인 차이 함량을 보였으나 식미에 따른 지방 함량간의 연관성은 확인할 수 없었다. 비전분 지질 함량 구성 지방산 조성비에서 가장 많은 비율을 차지하고 있는 oleic, linoleic acid를 비교해 보면, oleic acid의 경우 식미가 좋지 않은 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 품종이 39.12~41.93%로 식미가 우수하거나(36.45~40.16%)나 중간 정도의 식미치를 나타낸 품종(34.26~43.42%)에 비해 높은 비율을 보인 반면, linoleic acid의 경우 37.20~38.91%로 낮은 함량 비율을 나타내었다. 또한 식미치가 낮은 품종들이 식미가 우수한 품종들에 비해 palmitic acid는 낮은 함량비(16.70~18.47%)를 나타내었고 stearic acid 조성비에서는 높은 함량 비율(1.43~2.73%)을 나타내는 경향이였다. Myristic acid는 0.25~0.41%로 품종간의 차이가 적었으며 그 외 미량 차지하고 지방산 조성으로 palmitoleic, linolenic, arachidic, gadoleic acid는 0.02~0.12%, 0.90~1.18%, 0.20~0.59%, 0.08~0.44%의 함량 비율을 나타내었다 (Table 4-22).

한편, 비전분 지질 함량 및 각각의 지방산 조성비간의 상관관계를 비교해 본 결과, Myristic acid는 palmitoleic, stearic acid와 정의 상관관계를 보였다. Palmitic acid는 linoleic acid와는 정의 상관관계를, oleic, arachidic, gadoleic acid와는 부의 상관관계를 나타내었다. Oleic acid 조성비는 palmitic acid, linoleic acid와 각각 부의 상관관계가 있음을 알 수 있었다(Table 4-23).

Table 4-22. Fatty acid composition of non-starch lipid in milled rice varieties

Variety	Total lipid (mg/g)	Fatty acid composition (%)								
		Myristic acid C _{14:0}	Palmitic acid C _{16:0}	Palmitoleic acid C _{16:1}	Stearic acid C _{18:0}	Oleic acid C _{18:1}	Linoleic acid C _{18:2}	Linolenic acid C _{18:3}	Arachidic acid C _{20:0}	Gadoleic acid C _{20:1}
Koshihikari	7.33 ^b	0.27 ^a	19.10 ^{efg}	0.07 ^{abc}	1.38 ^{ab}	40.16 ^{bc}	37.64 ^{abc}	1.00 ^{bc}	0.26 ^a	0.14 ^{ab}
Samgwangbyeo	11.10 ^e	0.28 ^a	18.78 ^{defg}	0.05 ^{ab}	1.56 ^{ab}	38.83 ^b	38.58 ^{abcd}	1.18 ^f	0.48 ^{bc}	0.25 ^{cd}
Gopumbyeo	8.85 ^c	0.38 ^{ab}	18.50 ^{cdef}	0.12 ^c	2.19 ^{cd}	36.45 ^a	40.55 ^{cf}	1.15 ^{ef}	0.40 ^b	0.25 ^{cd}
Chuchungbyeo	10.60 ^{de}	0.27 ^a	18.21 ^{bcd}	0.02 ^a	1.62 ^{abc}	38.73 ^b	39.44 ^{cde}	0.96 ^{ab}	0.46 ^b	0.30 ^d
Hwaseongbyeo	13.67 ^g	0.29 ^{ab}	20.94 ^h	0.05 ^{ab}	1.38 ^{ab}	34.26 ^a	41.81 ^f	0.98 ^{ab}	0.21 ^a	0.08 ^a
Dongjinbyeo	9.83 ^{cd}	0.33 ^{ab}	20.12 ^{gh}	0.04 ^{ab}	1.47 ^{ab}	36.23 ^a	40.39 ^{def}	1.06 ^{bcde}	0.24 ^a	0.12 ^{ab}
Ilpumbyeo	12.50 ^f	0.25 ^a	16.02 ^a	0.02 ^a	1.47 ^{ab}	43.42 ^d	36.77 ^a	1.03 ^{bcd}	0.57 ^c	0.46 ^e
Hwacheongbyeo	10.40 ^{de}	0.31 ^{ab}	20.00 ^{fgh}	0.04 ^{ab}	1.14 ^a	35.59 ^a	41.53 ^f	1.02 ^{bcd}	0.24 ^a	0.12 ^{ab}
Palgongbyeo	8.70 ^c	0.33 ^{ab}	16.70 ^{ab}	0.07 ^{abc}	1.95 ^{bc}	40.13 ^{bc}	38.91 ^{bcde}	1.16 ^f	0.41 ^b	0.33 ^d
Samnambyeo	14.03 ^g	0.30 ^{ab}	17.04 ^{abc}	0.02 ^a	1.43 ^{ab}	40.67 ^{bc}	38.53 ^{abcd}	1.11 ^{def}	0.46 ^b	0.44 ^e
Singeumbyeo	4.80 ^a	0.31 ^{ab}	17.19 ^{abcd}	0.07 ^{abc}	1.85 ^{bc}	41.93 ^{cd}	37.20 ^{ab}	1.09 ^{cdef}	0.20 ^a	0.18 ^{bc}
Dobongbyeo	12.36 ^f	0.41 ^c	18.47 ^{cdef}	0.10 ^{bc}	2.73 ^d	39.12 ^b	37.44 ^{ab}	0.90 ^a	0.59 ^c	0.25 ^{cd}

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 4-23. Correlation coefficients among fatty acid composition of non-starch lipid in milled rice

	Total lipid	Myristic acid, C _{14:0}	Palmitic acid, C _{16:0}	Palmitoleic acid, C _{16:1}	Stearic acid, C _{18:0}	Oleic acid, C _{18:1}	Linoleic acid, C _{18:2}	Linolenic acid, C _{18:3}	Arachidic acid, C _{20:0}	Gadoleic acid, C _{20:1}
Total lipid	1.00	-0.08	0.12	-0.42	-0.12	-0.20	0.21	-0.28	0.48	0.34
Myristic acid, C _{14:0}		1.00	0.12	0.77**	0.81**	-0.30	0.13	-0.43	0.13	-0.15
Palmitic acid, C _{16:0}			1.00	0.10	-0.27	-0.90**	0.74**	-0.31	-0.58*	-0.86**
Palmitoleic acid, C _{16:1}				1.00	0.75**	-0.18	-0.02	0.10	-0.03	-0.29
Stearic acid, C _{18:0}					1.00	0.14	-0.33	-0.10	0.47	0.16
Oleic acid, C _{18:1}						1.00	-0.93**	0.13	0.47	0.70*
Linoleic acid, C _{18:2}							1.00	0.22	-0.50	-0.54
Linolenic acid, C _{18:3}								1.00	-0.04	0.24
Arachidic acid, C _{20:0}									1.00	0.80**
Gadoleic acid, C _{20:1}										1.00

*, **: Significant at 5% and 1% level, respectively

(나) 전분지질(Starch lipid) 함량 및 지방산 조성

Amylose-lipid complex 형성이 가열 및 호화시 아밀로오스 용출을 방해할 수 있으므로 (Choi, 2002) 취반 후 밥의 식미에 영향을 줄 가능성이 예상되므로 식미치가 다른 12품종의 starch lipid 함량 및 조성비를 비교하여 식미와의 관련성을 알아보았다. 전분지질 함량은 식미치가 우수한 고시히까리, 삼광, 고품 품종이 0.98~1.15%로 중간정도 식미치를 나타낸 추청, 화성, 동진, 일품, 화청(0.92~1.09%)나 식미가 나쁜 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 품종들(0.84~1.16%)에 비해 높은 함량을 보이는 경향이였다. 아밀로오스와 결합하고 있는 전분지질의 지방산 조성에서는 비전분 지질 지방산 조성비와 달리 palmitic acid의 조성비가 전체 지방산 조성비에서 가장 높은 함량 비율을 나타내었지만(38.25~46.08%) 식미 차이에 따른 품종들 간에 조성비 차이는 없었다. Linolenic acid의 경우 식미가 우수하거나(30.32~34.77%) 중간정도의 식미치를 나타낸 품종들(30.59~35.03%)이 식미가 나쁜 품종들(23.90~34.52%)에 비해 대체로 높은 함량 비율을 보여 전분 지질 구성 linoleic acid 조성비가 식미에 영향을 줄 것으로 예상 할 수 있겠다 (Table 4-24).

한편, 전분지질 함량 및 각각의 지방산 조성비간의 상관관계를 비교해 본 결과(Table 4-25), oleic acid는 myristic acid와 정의 상관관계를 보였으며 linoleic acid는 palmitic, stearic acid와는 부의 상관관계를 나타내었다. Stearic acid 조성비는 linoleic acid와는 부의 상관관계를, arachidic acid와는 정의 상관관계를 나타내었다.

Table 4-24. Fatty acid composition of starch lipid in milled rice cultivars

Variety	Total lipid (mg/g)	Fatty acid composition (%)								
		Myristic acid C _{14:0}	Palmitic acid C _{16:0}	Palmitoleic acid C _{16:1}	Stearic acid C _{18:0}	Oleic acid C _{18:1}	Linoleic acid C _{18:2}	Linolenic acid C _{18:3}	Arachidic acid C _{20:0}	Gadoleic acid C _{20:1}
Koshihikari	11.50 ^d	1.92 ^b	40.60 ^{ab}	0.05 ^{bc}	3.28 ^{ab}	22.86 ^{fg}	30.32 ^b	0.76 ^{ab}	0.12 ^{bc}	0.08 ^a
Samgwangbyeo	11.33 ^d	1.66 ^{ab}	42.06 ^{bc}	0.04 ^{ab}	3.35 ^{ab}	16.05 ^a	34.77 ^{de}	1.83 ^{de}	0.13 ^c	0.11 ^a
Gopumbyeo	9.76 ^{bc}	1.66 ^{ab}	38.25 ^a	0.04 ^{ab}	4.48 ^c	20.08 ^{cde}	33.13 ^{cd}	2.02 ^{de}	0.15 ^c	0.19 ^a
Chuchungbyeo	8.40 ^a	1.57 ^{ab}	44.32 ^{cd}	0.05 ^{bc}	3.85 ^{bc}	16.08 ^a	31.66 ^{bc}	2.25 ^e	0.13 ^c	0.09 ^a
Hwaseongbyeo	9.56 ^{ab}	1.54 ^{ab}	41.34 ^b	0.03 ^a	2.89 ^a	18.25 ^b	35.03 ^e	0.72 ^{ab}	0.11 ^{bc}	0.08 ^a
Dongjinbyeo	9.80 ^{bc}	1.42 ^a	46.08 ^d	0.04 ^{ab}	3.05 ^a	17.89 ^b	30.59 ^b	0.79 ^{ab}	0.08 ^{ab}	0.06 ^a
Ilpumbyeo	9.20 ^{ab}	2.46 ^c	38.29 ^a	0.07 ^c	4.20 ^c	18.96 ^{bcd}	33.41 ^{cde}	2.34 ^e	0.13 ^c	0.14 ^a
Hwacheongbyeo	10.86 ^{cd}	1.91 ^b	44.58 ^d	0.02 ^a	2.77 ^a	18.20 ^b	31.64 ^{bc}	0.76 ^{ab}	0.05 ^a	0.08 ^a
Palgongbyeo	8.96 ^{ab}	1.98 ^b	39.75 ^{ab}	0.03 ^a	4.29 ^c	20.50 ^{de}	31.93 ^{bc}	1.18 ^{bc}	0.16 ^c	0.18 ^a
Samnambyeo	8.80 ^{ab}	1.64 ^{ab}	40.55 ^{ab}	0.07 ^c	2.94 ^a	18.77 ^{bc}	34.52 ^{de}	1.23 ^{bc}	0.13 ^c	0.15 ^a
Singeumbyeo	11.63 ^d	2.53 ^c	40.13 ^{ab}	0.04 ^{ab}	2.93 ^a	23.57 ^g	30.08 ^b	0.50 ^a	0.12 ^{bc}	0.10 ^a
Dobongbyeo	8.43 ^a	1.80 ^{ab}	43.97 ^{cd}	0.07 ^c	6.64 ^d	21.56 ^{ef}	23.90 ^a	1.67 ^{cd}	0.26 ^d	0.13 ^a

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 4-25 Correlation coefficients among fatty acid composition of starch lipid in milled rice

	Total lipid	Myristic acid, C _{14:0}	Palmitic acid, C _{16:0}	Palmitoleic acid, C _{16:1}	Stearic acid, C _{18:0}	Oleic acid, C _{18:1}	Linoleic acid, C _{18:2}	Linolenic acid, C _{18:3}	Arachidic acid, C _{20:0}	Gadoleic acid, C _{20:1}
Total lipid	1.00	0.30	-0.21	-0.46	-0.55	0.28	0.14	-0.55	-0.50	-0.40
Myristic acid, C _{14:0}		1.00	-0.44	0.15	0.05	0.58*	-0.15	-0.15	0.05	0.18
Palmitic acid, C _{16:0}			1.00	0.02	0.28	-0.23	-0.63*	-0.71	0.16	-0.53
Palmitoleic acid, C _{16:1}				1.00	0.48	0.13	-0.27	0.47	0.57	0.26
Stearic acid, C _{18:0}					1.00	0.24	-0.66*	0.53	0.91**	0.49
Oleic acid, C _{18:1}						1.00	-0.53	-0.48	0.34	0.18
Linoleic acid, C _{18:2}							1.00	0.11	-0.57	0.11
Linolenic acid, C _{18:3}								1.00	0.40	0.46
Arachidic acid, C _{20:0}									1.00	0.52
Gadoleic acid, C _{20:1}										1.00

*, **: Significant at 5% and 1% level, respectively

(다) 식물성 스테롤류(Phytosterol) 함량 비교

쌀에 함유되어 있는 식물성 스테로이드류들의 함량과 식미와의 연관성에 대해서는 전혀 연구된바 없으므로 본 실험에서는 이들 조성 함량이 취반 식미 혹은 윤기와의 연관성 있을 가능성을 알아보기 위해 식미가 다른 12품종의 식물성 스테로이드류의 함량을 비교하였다(Table 4-26). 12품종 쌀의 주요 식물성 스테롤류인 sitosterol은 49.37~76.19 μg 으로 가장 높은 함량을 보였으며 campesterol, stigmasterol은 각각 18.15~34.39 μg , 15.14~22.40 μg 으로 품종간의 차이는 있었으나 중간정도의 식미치를 나타낸 품종들이 높은 함량을 나타낸 경향을 보여 식미치와는 관련성이 없는 듯 하였다. Squalene의 함량은 식미가 우수한 품종이거나 중간 정도의 식미치를 나타낸 품종들이 식미가 나쁜 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 품종에 비해 높은 함량을 나타내는 경향을 보여 squalene 과 식미와의 상관성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 식미가 우수한 삼광 품종의 경우 오히려 스쿠알렌 함량은 낮았다. Cycloartenol 함량 역시 squalene 함량과 같은 경향으로 식미가 우수한 품종이 높은 함량을 나타내었다. 또한 다른 곡류 유래 식물성 스테롤류에는 거의 함유되어 있지 않은 24-Methyl-cycloartanol 역시 품종간의 차이는 있었으나 식미치 간의 상관성은 없는 듯 하였다.

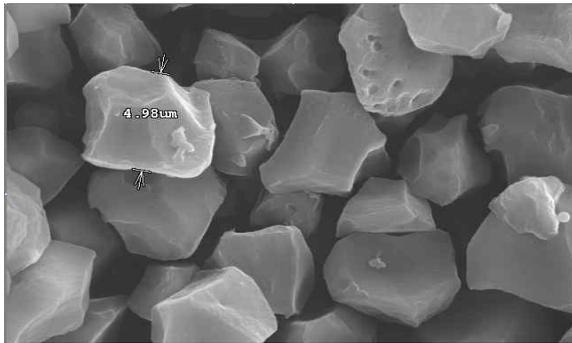
Table 26. Phytosterols and squalene composition in rice variety

Variety	Squalene	Phytosterol				
		Campesterol	Stigmasterol	Sitosterol	Cycloartenol	24-Methyl-cycloartanol
Koshihikari	20.73±0.18 ^h	34.39±1.65 ^h	21.36±1.97 ^d	70.62±1.36 ^{de}	29.38±1.70 ^e	17.56±1.73 ^{ef}
Samgwangbyeo	6.82±0.50 ^b	18.97±0.60 ^{ab}	15.14±0.56 ^a	58.19±1.51 ^b	21.48±0.37 ^{bc}	13.38±0.37 ^{ab}
Gopumbyeo	15.28±1.11 ^f	18.15±1.29 ^a	15.56±0.60 ^a	50.36±1.75 ^a	27.82±0.55 ^e	11.80±0.66 ^a
Chuchungbyeo	11.12±0.19 ^d	28.09±0.93 ^f	18.63±0.93 ^b	76.19±1.93 ^f	28.62±1.02 ^e	15.77±0.59 ^{cde}
Hwaseongbyeo	18.57±0.58 ^g	27.63±0.32 ^f	21.14±0.09 ^{cd}	71.27±0.19 ^{de}	23.97±1.00 ^d	17.59±0.81 ^{ef}
Dongjinbyeo	15.03±0.98 ^f	23.43±1.17 ^d	19.78±1.14 ^{bc}	71.15±2.58 ^{de}	17.58±1.50 ^b	14.60±1.18 ^{bcd}
Ilpumbyeo	15.88±0.32 ^f	26.07±0.66 ^e	22.40±0.13 ^d	65.45±0.83 ^c	36.99±0.37 ^f	16.35±0.34 ^{de}
Hwacheongbyeo	13.72±0.34 ^e	30.83±0.42 ^g	18.68±0.29 ^b	72.80±1.17 ^{ef}	21.60±0.32 ^{bc}	15.47±0.47 ^{cd}
Palgongbyeo	6.50±0.29 ^b	20.07±0.47 ^b	16.64±1.03 ^a	52.00±1.00 ^a	15.77±0.34 ^{ab}	14.31±0.28 ^{bc}
Samnambyeo	8.98±0.48 ^c	21.79±0.25 ^c	16.00±0.46 ^a	49.37±1.21 ^a	23.59±1.36 ^{cd}	12.73±0.51 ^{ab}
Singeumbyeo	9.49±1.24 ^c	28.82±1.12 ^f	22.30±0.00 ^d	68.22±2.03 ^{cd}	16.05±1.03 ^{ab}	19.98±0.77 ^g
Dobongbyeo	4.99±0.07 ^a	23.04±0.18 ^{cd}	18.87±0.29 ^b	51.63±1.33 ^a	14.47±0.48 ^a	19.32±0.12 ^{fg}

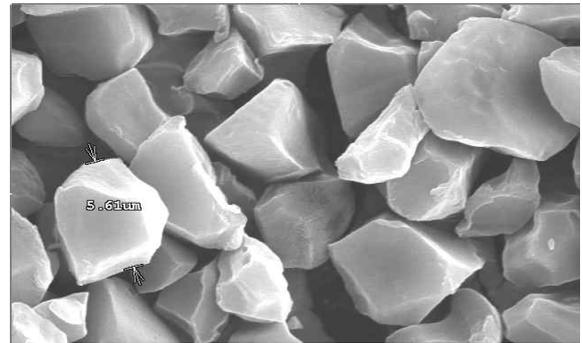
Data were presented as means standard deviation.

(4) 쌀 전분 입자 형태 관찰

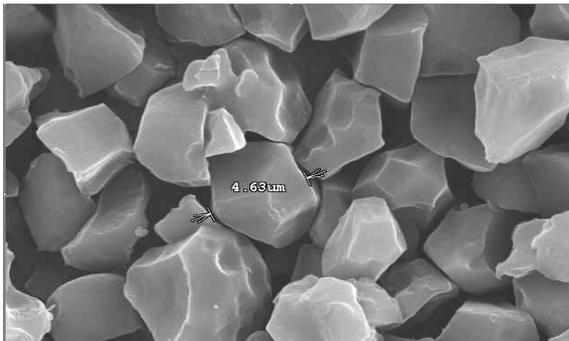
주사전자현미경을 이용하여 쌀 배유 전분 분획을 관찰한 결과는 Fig. 4-11과 같다. 전분립 모양은 불규칙한 다각형 형태로 단축 단면은 대부분 사각형이나 오각형을 나타내었고 크기는 약 2~6 μm 의 분포를 보였다. 식미에 따른 품종 간 형태 차이는 크지 않았으나 식미가 우수한 품종일수록 모양이 더 선명하고 매끄러운 형태를 나타내었으며 화성, 팔공, 삼남 품종의 경우 다른 품종에 비해 형태가 매끄럽지 못하였다. 또한 전분 입자 표면에 움푹 들어간 흔적을 관찰할 수 있었는데 이는 전분에 붙어있던 단백질 입자의 흔적으로 전분 분리과정에서 단백질 입자들이 떨어져 나가 생긴 것으로 생각된다(Juliano & Donald, 1985).



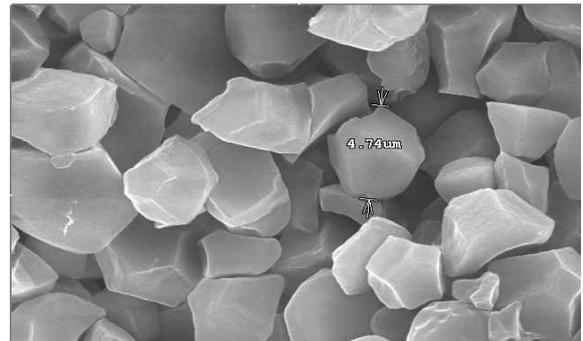
Koshihikari



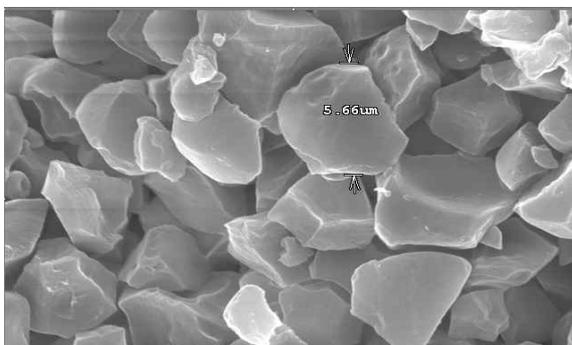
Samgwangbyeo



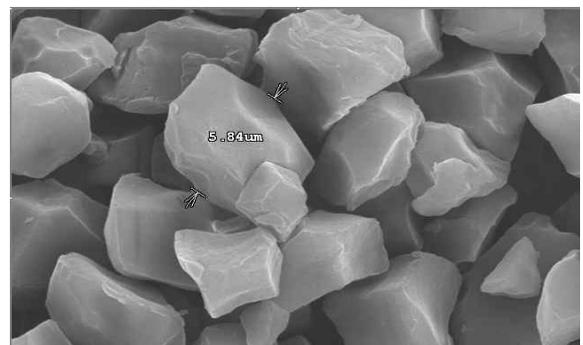
Gopumbyeo



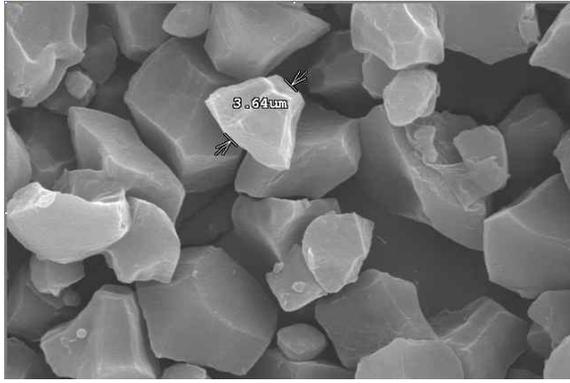
Chuchungbyeo



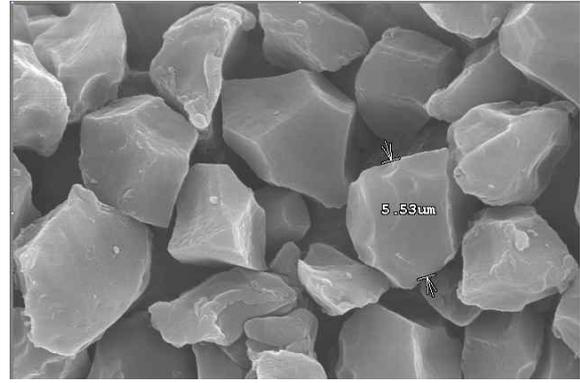
Hwaseongbyeo



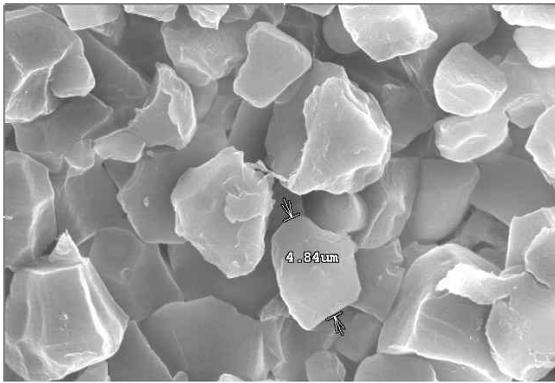
Dongjinbyeo



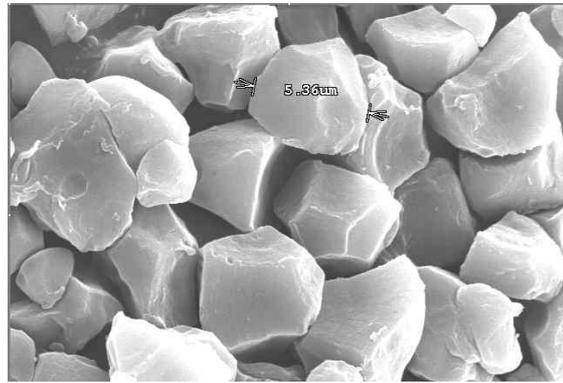
Ipumbyeo



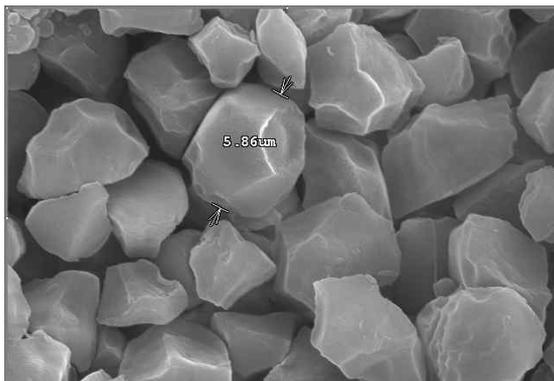
Hwacheongbyeo



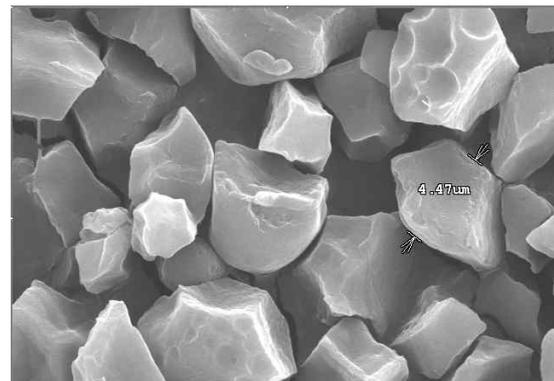
Palgongbyeo



Samnambyeo



Singeumobyeo



Dobongbyeo

Fig. 4-12. Scanning electron micrographs of rice starches ($\times 5000$).

(5) 호화특성

(가) 팽윤력 측정

쌀가루의 호화특성을 검토하기 위한 또 하나의 방법으로써 품종별 쌀가루 및 전분입자의 온도에 따른 팽윤력의 변화를 비교하여 Table 4-27에 나타내었다. 12 품종 쌀가루 및 전분입자 모두 온도가 증가함에 따라 팽윤력은 증가하는 양상을 보였다. 온도상승에 따른 변화양상을 보면 55°C에서 서서히 팽윤되기 시작하여 그 이후에는 급격히 증가하기 시작하여 95°C에서는 팽윤력이 쌀가루 및 전분 각각 약 15, 20 정도에 이르고 있다. 전분 입자는 찬물에서는 녹지 않으나 조금씩 팽윤하여 부분적으로 수화되며 전분 입자를 가열함에 따라 glass transition temperature라고 정의되어진 특정 온도에 도달하게 되는데 그 온도에서 많이 팽윤된다고 하였다(Biliaderis et al., 1980). 모든 품종에서 쌀가루의 팽윤력이 전분에 비해 낮음을 알 수 있었으며 65°C부터는 12품종 전체 쌀가루와 쌀 전분의 팽윤력이 $p < 0.01$ 수준에서 유의적인 차이를 보였다. 쌀에 소량 존재하는 지방질은 전분의 호화 중에 아밀로오스와 복합체를 형성하여 전분입자의 팽윤을 억제한다고 하였다(Tester & Morrison, 1990a).

품종 간 쌀가루 팽윤력의 차이를 비교해보면 수화초기, 65°C의 경우 식미특성에서 가장 낮은 값을 보인 도봉 품종이 다른 품종에 비해 두드러지게 낮았다. 쌀가루 팽윤력은 75°C, 85°C, 95°C일 때 각각 7.30~8.53, 9.67~10.79, 13.82~16.30의 값을 나타내어 품종 간에 차이는 크지 않았으며 95°C의 경우 고시히까리, 삼광, 고품 등 식미가 우수한 품종의 팽윤력이 높게 나타나는 양상을 보였다.

한편, 쌀 전분 팽윤력은 수화초기, 55°C에서 팽윤되기 시작하여 65°C 온도에서 도봉을 제외한 모든 품종에서 많이 팽윤하기 시작하여 75°C, 85°C, 95°C에서는 쌀가루 팽윤력에 비해 유의적으로 높게 나타내었다($p < 0.001$). 온도증가에 따른 전분의 팽윤력은 품종 간 큰 차이를 보이지 않았으나 95°C에서 식미치가 가장 높은 고시히까리 품종이 가장 높은 팽윤력(23.38)을 나타내었다. 이와 관련하여 탈지한 감자전분의 호화특성을 보고한 결과에서는 탈지한 전분의 팽윤력이 생전분에 비해 증가하는 것은 생전분에 함유된 지질 성분들이 아밀로오스 나선구조 내에서 amylose-lipid complex를 이루고 있어 입자의 팽창을 저해하기 때문이라고 하였으며 온도가 높아질수록 complex 구조가 느슨해지며 일정온도가 되면 전분 입자는 팽윤하기 시작하여 물분자를 흡수하기 시작한다고 하였다(Goshima et al., 1985).

Table 4-27. Temperature effects on swelling powers of 12 rice cultivars

	Variety	Temperature (°C)				
		55	65	75	85	95
Flours	Koshihikari	2.60 ^a	5.84 ^b	8.32 ^{bc}	9.92 ^{ab}	16.30 ^d
	Samgwangbyeo	3.39 ^{cd}	6.53 ^{de}	7.56 ^{ab}	9.76 ^{ab}	15.26 ^c
	Gopumbyeo	3.58 ^d	6.50 ^{de}	8.15 ^{abc}	10.09 ^{abc}	15.31 ^c
	Chuchungbyeo	3.41 ^{cd}	6.28 ^{cd}	7.30 ^a	9.78 ^{ab}	15.24 ^c
	Hwaseongbyeo	3.25 ^{bc}	5.52 ^b	7.93 ^{abc}	9.69 ^{ab}	13.82 ^a
	Dongjinbyeo	2.96 ^b	6.75 ^e	8.53 ^c	10.79 ^d	14.56 ^{abc}
	Ipumbyeo	3.50 ^{cd}	6.68 ^{de}	7.52 ^{ab}	9.67 ^a	15.41 ^c
	Hwacheongbyeo	3.01 ^b	6.42 ^{de}	8.20 ^{abc}	10.00 ^{abc}	14.30 ^{ab}
	Palgongbyeo	3.44 ^{cd}	5.65 ^b	8.51 ^c	9.76 ^{ab}	15.01 ^{bc}
	Samnambyeo	3.00 ^b	5.90 ^{bc}	8.08 ^{abc}	10.02 ^{abc}	14.95 ^{bc}
	Singeumbyeo	2.97 ^b	5.48 ^b	8.00 ^{abc}	10.26 ^{bcd}	14.92 ^{bc}
	Dobongbyeo	2.60 ^a	2.91 ^a	7.32 ^a	10.52 ^{cd}	14.65 ^{abc}
	Mean	3.14	5.87	7.95	10.02	14.98
Starches	Koshihikari	3.24 ^b	8.08 ^c	10.48 ^{bc}	15.71 ^{bcd}	23.38 ^d
	Samgwangbyeo	4.13 ^{ef}	9.46 ^{de}	10.65 ^{bc}	16.33 ^d	20.01 ^{bc}
	Gopumbyeo	3.67 ^{bcde}	8.28 ^{cd}	9.65 ^{ab}	13.46 ^a	17.89 ^a
	Chuchungbyeo	3.72 ^{bcde}	9.90 ^e	11.03 ^c	16.00 ^{cd}	18.84 ^{ab}
	Hwaseongbyeo	3.87 ^{cdef}	9.09 ^{cde}	10.90 ^c	15.70 ^{bcd}	18.57 ^{ab}
	Dongjinbyeo	4.09 ^{def}	9.12 ^{cde}	11.07 ^c	15.68 ^{bcd}	20.00 ^{bc}
	Ipumbyeo	4.16 ^{ef}	9.96 ^e	10.86 ^c	14.62 ^{ab}	20.74 ^c
	Hwacheongbyeo	3.88 ^{cdef}	9.10 ^{cde}	10.66 ^{bc}	14.97 ^{bc}	19.22 ^{ab}
	Palgongbyeo	3.61 ^{bcd}	8.39 ^{cd}	10.59 ^{bc}	14.70 ^{abc}	19.99 ^{bc}
	Samnambyeo	4.36 ^f	8.89 ^{cde}	10.99 ^c	15.25 ^{bcd}	19.15 ^{ab}
	Singeumbyeo	3.46 ^{bc}	6.65 ^b	10.73 ^{bc}	14.49 ^{ab}	19.13 ^{ab}
	Dobongbyeo	2.77 ^a	2.96 ^a	8.86 ^a	17.98 ^e	19.71 ^{bc}
	Mean	3.75	8.32 ^{**}	10.54 ^{***}	15.41 ^{***}	19.72 ^{***}

Results are means of triplicate determinations

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

(나) RVA에 의한 호화특성

곡물 및 전분 가루의 호화점도 특성, 가공품의 cooking과 가공특성을 평가하기 위해 짧은 측정시간과 적은 시료 양으로도 충분한 RVA (Rapid Visco Analyzer)가 효과적이어서 많은 연구에서 사용되고 있다(Wrigley et al., 1996; Okadome et al., 1998; Lim et al., 1999). 식미에서 차이를 보이는 12 품종 쌀가루들의 호화개시온도와 여러 가지 점도 특성은 품종 간에 유의한 차이를 나타내고 있었다(Table 4-28). 품종별 쌀가루의 호화온도는 68.9°C~82.5°C의 범위로써 식미가 우수한 고시히까리, 삼광, 고품 품종은 69.83~71.48°C로 고품이 가장 낮은 호화온도를 보였으며 중간 식미치 가진 품종에서는 68.93~70.52°C의 범위로 품종 간 비슷한 호화온도를 나타내었다. 저 식미치를 보인 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 품종은 식미가 우수하거나 중간 식미치를 가진 품종에 비해 72.30~82.50°C로 높은 호화온도 분포를 나타내어 이들 호화온도의 차이가 식미치를 반영하는 것으로 보인다. 또한 호화온도는 품종 간 전분입자의 내부구조 차이 혹은 단백질, 지질 차이로 인하여 가열시 느리게 팽윤됨과 동시에 호화온도에 영향을 미친 것으로 생각된다. 최고점도(peak)는 전분입자의 팽윤정도와 열이나 전단력에 대한 팽윤된 입자의 저항정도를 나타내며 아밀로오스의 용출속도에 영향을 받는다고 하였으며 가용성 전분의 농도가 점도조절의 요인이 되어 농도를 증가시키면 급격하게 점도가 증가한다고 보고하였다(Ghiasi et al., 1982). 또한 최고점도와 최저점도의 차이를 나타내는 강하점도(breakdown)는 팽윤한 전분입자의 단단함과 부드러움에 기인하고 전분립의 깨지는 정도와 호화액의 안정성을 나타내며 RVA에서 최고점도에 도달했을 때 아밀로오스는 용해된다. 품종 간 차이를 보면, 식미가 우수한 고시히까리, 삼광, 고품 품종이 804.00~965.00로 높은 분포를 보였고 중간정도의 식미치를 가진 품종은 501.00~986.00로 낮은 분포를 나타내었다. 또한 도봉을 비롯한 낮은 식미치 품종은 686.67~1313.00의 분포를 보였다. 한편, 호화 액의 냉각 시 아밀로오스는 분자간의 많은 수소결합을 통해 회합체를 구성함으로써 점도가 증가하게 되는데, 이때(50°C)의 냉각점도의 증가와 setback은 전분 노화경향을 반영하며 값이 클수록 노화가 쉽게 일어난다고 보고(Ghiasi et al., 1982) 하였는데 식미가 우수한 고시히까리, 중간 식미치를 나타낸 동진, 식미가 나쁜 품종인 삼남과 도봉이 다른 품종에 비해 낮은 값을 보여 이들 품종은 다른 품종들에 비하여 노화가 더디게 일어난다고 볼 수 있겠다. Lorenz(1976)은 여러 종류의 전분을 탈지시켰을 때 점도 곡선이 탈지하지 않는 생전분 보다 상당히 증가함을 보인다고 하였으며 쌀 전분의 경우에는 탈지하면 setback이 증가하여 노화가 더 쉽게 일어난다고 하였다.

Table 4-28. Pasting properties of twelve rice flours by rapid visco-analyzer

Variety	Pasting Temp. (°C)	Viscosity(cP)				
		Peak	Trough	Final	Breakdown	Setback
Koshihikari	71.48 ^c	3084.00 ^d	2119.00 ^h	3076.00 ^g	965.00 ^e	-8.00 ^c
Samgwangbyeo	70.23 ^b	2386.33 ^b	1582.33 ^{de}	2639.00 ^{de}	804.00 ^{cd}	252.67 ^e
Gopumbyeo	69.83 ^{ab}	2708.67 ^c	1762.00 ^{fg}	2822.33 ^f	946.67 ^e	113.67 ^d
Chuchungbyeo	69.75 ^{ab}	2003.67 ^a	1265.33 ^b	2201.00 ^b	738.33 ^{bcd}	197.33 ^e
Hwaseongbyeo	70.20 ^b	2145.00 ^a	1435.33 ^c	2462.67 ^c	709.67 ^{bc}	317.37 ^f
Dongjinbyeo	69.75 ^{ab}	2062.33 ^a	1076.33 ^a	1889.00 ^a	986.00 ^e	-173.33 ^b
Ilpumbyeo	68.93 ^a	2632.00 ^c	2131.00 ^h	3178.00 ^g	501.00 ^a	546.00 ^h
Hwacheongbyeo	70.52 ^b	2142.67 ^a	1477.33 ^{cd}	2511.67 ^{cd}	665.33 ^b	369.00 ^{fg}
Palgongbyeo	72.77 ^d	2622.67 ^c	1638.67 ^{ef}	2723.00 ^{ef}	984.00 ^e	100.33 ^d
Samnambyeo	72.30 ^{cd}	1993.00 ^a	1164.67 ^{ab}	2056.67 ^b	828.33 ^d	63.67 ^d
Singeumbyeo	73.92 ^e	2407.67 ^b	1721.00 ^{fg}	2793.67 ^{ef}	686.67 ^b	386.00 ^g
Dobongbyeo	82.52 ^f	3146.00 ^d	1833.00 ^g	2540.00 ^{cd}	1313.00 ^f	-606.00 ^a

Results are means of triplicate determinations

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

(다) 시차주사열량기(DSC)에 의한 쌀 전분의 호화 특성

전분 입자에 충분한 물을 가하고 가열하면 결정이 용해되어 무정형 상태로 변하는 상전이 (phase transition) 현상, 즉 호화가 일어난다. 쌀 전분의 DSC에 의한 호화양상은 식미치가 다른 12품종 간에 유의적인 차이를 나타내었다. 가장 낮은 식미치를 나타낸 도봉이 다른 품종들에 비해 호화개시, 호화피크, 호화종료 온도가 각각 75.25°C, 79.16°C, 90.06°C로 두드러지게 높게 나타내었다. 전분입자의 호화개시 온도는 도봉(75.25°C)을 제외하면 57.95°C에서부터 62.04°C 정도로써 차이를 보였으며 호화피크의 온도도 도봉(79.16°C)을 제외하면 대체로 64.31°C~69.67°C 근처이고, 호화종료 온도 역시 74.76°C~83.0°C 로써 차이를 나타내었다. 높은 식미치를 보인 고시히까리, 삼광, 고품 품종 중에서는 고시히까리가 호화개시, 피크, 종결온도에서 각각 61.33°C, 67.84°C, 79.14°C로써 가장 높은 온도를 나타내었다. Yuan et al.(1993)은 호화특성에서 호화온도가 높아지는 것은 아밀로펙틴 미세구조 차이에서 긴 사슬이 차지하는 비율이 많으면 보다 높은 온도를 필요로 하기 때문에 호화온도는 높아진다고 하였다. 한편, 전분의 호화온도가 진행되는 동안 필요한 에너지량인 호화 enthalpy는 DSC thermogram peak의 면적으로 나타내는데 peak의 면적이 클수록 입자가 호화될 때 많은 열량이 소모한다는 것을 나타낸다고

할 수 있다. 12 품종의 호화엔탈피는 2.63 J/g로부터 4.29 J/g까지의 변이를 나타내고 있었으며 도봉이 가장 높아 다른 쌀 품종들에 비해서 전분의 결정성 부분을 용융하는데 더 많은 에너지가 필요함을 보여주어 결정성이 크을 알 수 있었다. 호화개시온도, 피크온도, 종결온도에서와 마찬가지로 호화엔탈피에서도 고식미치 계열에서는 고시히까리(3.69 J/g), 중간식미치 계열에서는 동진(3.85 J/g), 저식미치 계열에서는 신금오(3.91 J/g), 도봉(4.29 J/g)이 높은 값을 나타내었다(Table 4-29). 한편, 전분의 amylose-lipid complex의 melting endotherm은 90~110°C 온도 범위에서 나타나는데(Daryl, 1983) 탈지전분의 경우 생전분보다 호화온도가 낮아졌으며 호화엔탈피도 낮은 경향을 보인다고 하였다. 이는 starch lipid 함량 및 조성이 호화 특성에 영향을 미치고 있음을 시사하며 본 실험에서 고, 중, 저 식미치에서 높은 호화개시, 피크, 종결온도 및 호화엔탈피를 보인 고시히까리, 동진, 신금오 품종의 경우 Table 27의 전분지질의 linoleic acid 조성비에서 비슷한 함량 비율을 나타내었는데, 이는 전분지질의 linoleic acid가 전분의 호화특성과 연관되어 있을 것으로 예상할 수 있겠다.

Table 4-29. Gelatinization and endotherm characteristics of rice starch granules

Variety	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔH (J/g)
Koshihikari	61.33±0.11 ^e	67.84±0.28 ^g	79.14±0.50 ^g	3.69±0.19 ^{ef}
Samgwangbyeo	58.86±0.10 ^c	64.92±0.15 ^{bc}	74.76±0.06 ^a	2.63±0.18 ^a
Gopumbyeo	58.40±0.33 ^b	65.19±0.10 ^{cd}	76.20±0.73 ^{abc}	3.19±0.10 ^{cd}
Chuchungbyeo	57.95±0.19 ^a	64.31±0.12 ^a	75.22±0.08 ^{ab}	2.82±0.24 ^{ab}
Hwaseongbyeo	59.71±0.15 ^d	66.40±0.05 ^e	78.17±0.05 ^{def}	3.07±0.15 ^{bc}
Dongjinbyeo	59.91±0.13 ^d	66.34±0.18 ^e	79.44±1.37 ^g	3.85±0.21 ^f
Ilpumbyeo	58.15±0.21 ^{ab}	64.65±0.09 ^{ab}	76.66±0.57 ^b	3.23±0.07 ^{cd}
Hwacheongbyeo	59.08±0.20 ^c	65.40±0.08 ^d	76.84±0.25 ^{cde}	3.40±0.14 ^{cde}
Palgongbyeo	59.92±0.08 ^d	67.07±0.12 ^f	78.67±0.66 ^g	3.35±0.25 ^{cd}
Samnambyeo	60.04±0.38 ^d	67.15±0.06 ^f	78.32±0.99 ^{ef}	3.50±0.21 ^{de}
Singeumobyeo	62.04±0.12 ^f	69.67±0.62 ^h	83.00±2.18 ^h	3.91±0.20 ^f
Dobongbyeo	75.25±0.26 ^g	79.16±0.16 ⁱ	90.06±0.24 ⁱ	4.29±0.14 ^g

Data were presented as means standard deviation.

Different letters within the same columns indicate significantly different at p<0.05.

(6) 아밀로오스 함량 및 쇠장(chain length) 비교

전분을 호화시킨 후 요오드 용액을 용액(I2-KI)을 처리하면 직선형의 포도당 사슬이 길수록 짙은 청자색을 띠게 되고 아밀로오스 분자는 아밀로펙틴 분자에 비해 요오드 결합 능력이 6~7배 정도 크며 요오드 반응은 전분의 직쇄상 분자의 상대적인 양을 나타내는 지표이므로 요오드 반응이 높다는 것은 직쇄상 분자가 많음을 의미한다.

식미와 관련되어 아밀로오스 함량이 높으면 전분입자의 팽윤이 충분히 일어나지 않으며 밥의 점도가 떨어지고 밥이 식었을 때는 팽윤 부족과 붕괴 부족으로 단단한 느낌을 준다 (Sandhya & Bhattacharya, 1995). 이는 아밀로스 함량이 높으면 호화된 전분분자들이 입자가 형성하는 그물구조의 골격의 근간인 amylopectin 분자에 걸처지는 상태가 되므로 결과적으로 amylopectin과 amylose에 의해 형성되는 전분 gel의 강도가 커지게 되는 것이다.

12 품종 쌀 배유 전분 분획을 알칼리 호화시킨 후 전분-I2복합체 형성에 기인하는 정색반응물의 680 nm에서의 흡광도로부터 아밀로오스 함량을 구하였고 500 nm에서부터 700 nm까지의 흡광도 spectrum으로부터 최대흡수파장(λ_{max}) 및 최대흡수파장에서의 흡광도(OD)로부터 아밀로오스 분자의 쇠장(chain length) 비교를 실시하였다. Table 4-30에 나타내고 있는 바와 같이 12 품종 쌀들의 아밀로오스 함량은 11.03~18.85%로 품종 간에 차이가 있었다. 식미가 우수한 고시히까리, 삼공, 고품은 16.53~17.40%로 삼공이 가장 낮은 함량을, 중간 식미치를 나타낸 추청, 화성, 동진, 일품, 화성은 16.24~18.85%, 식미가 좋지 않은 팔공, 삼남, 신금오, 도봉은 11.03~17.11%의 분포를 보였다. 가장 낮은 식미치를 나타낸 도봉이 가장 낮은 함량(11.03%)을, 중간 식미치를 가진 추청은 가장 높은 함량(18.85%)을 보였다. 도봉이 가장 낮은 아밀로오스 함량을 나타내고 있었는데, 식미치 결과에서는 가장 낮아 일반적으로 아밀로오스 함량이 높은 품종일수록 호화온도가 높고 밥의 질감이 단단하며 찰기가 떨어지고 (Juliano, 1985) 결국 식미가 낮다는 결과들과는 상이한 결과를 얻었다. 도봉 품종은 아밀로오스 함량은 낮지만 단단한 호화 gel을 형성하는 전분 분자 구조상의 특징을 가지는 품종인 것으로 예상할 수 있겠다. 쌀 품종 간 전분-I2 복합체가 형성하는 정색반응의 최대흡광도를 나타내는 파장(λ_{max})도 품종 간에 차이가 있었으며 도봉 품종을 제외하면 고시히까리가 가장 짧은 쇠장 길이를 보였고 amylose 함량이 높은 품종일수록 최대흡광도 파장이 장파장 쪽에 위치하며 amylose 함량이 낮은 품종일수록 최대흡광도 파장이 단파장 쪽에 위치하는 경향이 있었다. 일반적으로 아밀로오스 함량이 많을수록 밥맛이 떨어지는 것으로 보고되고 있으나 본 실험에 사용된 시료는 아밀로오스 함량이 밥맛 차이의 주된 인자가 아님을 알 수 있었다. 또한 쌀의 품질은 전체 아밀로오스함량 이외에도 전분의 불용성 아밀로오스함량이 중요하다고 하였으며 불용성 아밀로오스함량은 밥의 끈기와는 부의 상관성을, 팽화미에서 팽화부피와 정의 상관을 보여 (Bhattacharya et al., 1978; Bhattacharya et al., 1982; Chinnaswamy & Bhattacharya 1986) 이는 미질 평가에 중요한 인자라고 할 수 있겠다. 이렇듯 아밀로오스 함량 및 쇠장 길이 분포와 식미와의 연관성에 대해서는 보다 심도 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

Table 4-30. Amylose contents and wavelength in λ_{max} of iodine absorption of rice starches

Variety	Amylose contents (%)	Wavelength of maximum absorbance	
		Wavelength (nm)	Optical density
Koshihikari	16.24±0.32 ^b	567.3±1.5 ^b	0.31±0.01 ^{ab}
Samgwangbyeo	17.40±0.50 ^{bcde}	576.0±1.7 ^{de}	0.33±0.01 ^{bcd}
Gopumbyeo	16.53±0.50 ^{bc}	576.0±1.0 ^{de}	0.32±0.00 ^{abc}
Chuchungbyeo	18.85±0.50 ^e	578.0±1.0 ^e	0.34±0.00 ^{cd}
Hwaseongbyeo	17.98±0.80 ^{cde}	573.3±1.5 ^{cd}	0.33±0.02 ^{bcd}
Dongjinbyeo	18.27±0.60 ^{de}	576.6±1.0 ^e	0.33±0.01 ^{bcd}
Ilpumbyeo	16.24±0.50 ^b	576.3±0.5 ^e	0.30±0.01 ^a
Hwacheongbyeo	17.40±0.50 ^{bcde}	571.3±1.0 ^c	0.32±0.02 ^{abc}
Palgongbyeo	16.82±0.00 ^{bcd}	573.3±0.5 ^{cd}	0.31±0.00 ^{ab}
Samnambyeo	16.53±1.00 ^{bc}	572.6±1.1 ^c	0.30±0.01 ^a
Singeumbyeo	17.11±0.50 ^{bcd}	570.6±1.1 ^c	0.32±0.00 ^{abc}
Dobongbyeo	11.03±0.50 ^a	555.6±0.5 ^a	0.30±0.00 ^a

Data were presented as means standard deviation.

Different letters within the same columns indicate significantly different at $p < 0.05$.

(7) 단백질 함량

쌀 단백질은 취반 시 물의 흡수 및 전분의 팽창을 저해하고 밥의 질감에 매우 큰 영향을 미치며 벼 재배에서 질소비료의 시비량, 시비방법, 시비시기에 따른 환경적 변이가 큰 편이다. 단백질 함량이 높은 품종들의 밥은 찰기가 떨어진다고 알려져 있다(Ishima & Mijoshibal, 1974; Yanse *et al*, 1984; Shibuya, 1990). 식미가 다른 12품종 쌀의 단백질 함량 변이를 비교해본 결과, 식미가 우수한 고시히까리, 삼광, 고품 품종은 5.71~6.31% 함량 분포를 보였으며 고시히까리가 가장 낮은 함량을 나타내었다. 중간정도의 식미치를 나타낸 추청, 화성, 동진, 일품, 화청 품종은 5.84~6.65%의 분포 함량을 보였고 동진이 다른 품종에 비해 낮았다. 식미치가 낮은 품종인 팔공, 삼남, 신금오, 도봉은 6.89~8.24%로서 높은 단백질 함량 분포를 보여 식미치와 단백질 함량과의 상관성을 확인할 수 있었다(Fig. 4-13). 식미가 우수할수록 단백질 함량은 낮은 경향을 나타내어 식미와 단백질 함량과는 부의 상관성을 나타낸다는 결과와 일치하였다.

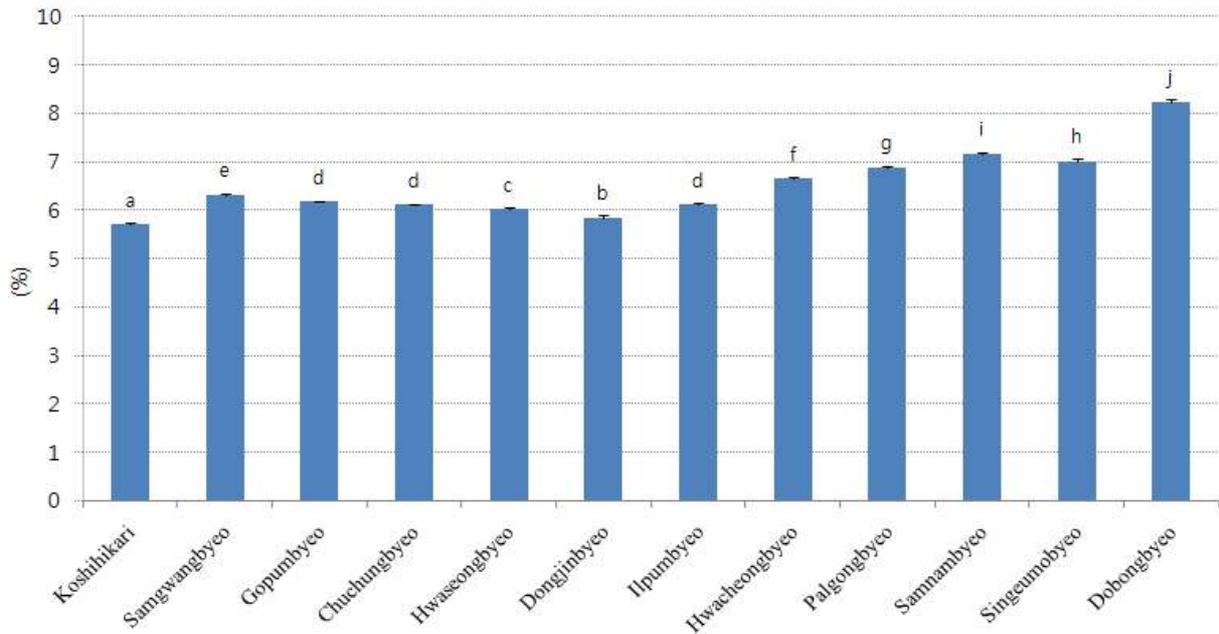


Fig. 4-13. Protein content of twelve rice cultivars.

Different letters within the same columns indicate significantly different at $p < 0.05$.

(8) 미량성분 함량 비교

무기성분은 대개 겨 층이나 백미의 바깥층에 많이 분포되어 있다. 인, 칼륨, 마그네슘 등은 호분 층 바깥층에 가장 많이 분포하고 호분층 중층까지도 상당히 많이 분포하는 경향이다. 쌀의 Mg/K 당량비가 높은 것이 밥이 더 찰기가 있는 경향이라고 보고(Choi, 2002)하여 쌀의 식미와 관련성을 제시하였다. 이에 식미치에 차이가 있는 12품종의 쌀의 미량성분의 함량을 비교하였다(Table 4-31).

고 식미치를 나타낸 고시히까리, 삼광, 고품 품종은 K과 Mg의 함량이 각각 2139~2178 μg , 704~1132.33 μg 의 함량 분포를 보였으며 Mg/K 비는 고시히까리(0.53)가 다른 품종들에 비해 가장 높은 비율을 나타내었다. 중간정도의 식미치를 가진 추청, 화성, 동진, 일품, 화청 품종은 K 및 Mg 함량이 각각 1737~2283 μg , 676~950 μg 의 함량 분포를 나타내어 이들 함량 조성비 (Mg/K)는 0.34~0.44의 비율을 보여 품종간의 차이를 보였다. 또한 저 식미치를 가진 팔공, 삼남, 신금오, 도봉 품종은 Mg/K 비율이 0.38~0.47을 보여 품종간의 차이를 보였다. 식미와 관련된 Mg/K 함량 비율과 전체 12 품종 간에는 차이를 보였으며 특히, 식미가 우수한 고시히까리가 가장 높은 비율을 보여 이들 미량원소 조성비와 식미는 관련성이 있을 것으로 여겨진다.

Table 4-31. Mineral content of rice varieties

Variety	(ug/g)			
	Ca	K	Mg	Mg/K
Koshihikari	148.20 ^{bc}	2139.00 ^d	1132.33 ^g	0.53 ^j
Samgwangbyeo	145.83 ^{bc}	2140.00 ^d	704.43 ^c	0.33 ^a
Gopumbyeo	148.63 ^c	2178.00 ^d	875.70 ^e	0.40 ^e
Chuchungbyeo	134.77 ^b	1737.67 ^a	595.93 ^a	0.34 ^b
Hwaseongbyeo	134.93 ^b	1964.67 ^{bc}	867.43 ^e	0.44 ^h
Dongjinbyeo	119.63 ^a	1964.00 ^{bc}	676.60 ^c	0.34 ^b
Ilpumbyeo	141.17 ^{bc}	2283.67 ^e	950.97 ^f	0.42 ^f
Hwacheongbyeo	138.50 ^{bc}	2208.00 ^d	798.33 ^d	0.36 ^c
Palgongbyeo	146.07 ^{bc}	1991.33 ^c	873.10 ^e	0.44 ^h
Samnambyeo	171.50 ^c	1674.33 ^a	784.50 ^d	0.47 ⁱ
Singeumbyeo	121.40 ^a	1686.33 ^a	634.43 ^b	0.38 ^d
Dobongbyeo	217.10 ^d	1901.67 ^b	811.17 ^d	0.43 ^g

Results are means of triplicate determinations

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

(9) 식미와 배유성분 특성간의 상관관계

12 품종에 대한 식미치와 분석한 배유 성분 특성과의 상관관계를 Table 4-32에 나타내었다. 식미치는 취반밥의 윤기, 구수한 냄새, 조직감, 전반적인 기호도 등 관능검사 결과와는 정의 상관관계를 나타내었다. 취반 밥의 윤기 및 구수한 냄새를 제공 할 가능성이 예상되어 검토했던 쌀 배유 지용성 성분 및 전분 지질과 식미와의 관계에서는 비전분지질 조성 stearic acid와는 부의 상관성을, 전분지질 구성 linoleic acid 조성과는 정의 상관성을 나타내어 linoleic acid가 전분복합체의 주요 구성 지질 분자일 경우에는 식미에 바람직한 영향을 줄 것으로 생각된다. 반면 arachidic acid와는 부의 상관성을 나타내었다. 식물성 스테롤인 squalene, cycloartenol과도 정의 상관관계를 나타내어 이들 조성 함량 또한 많을수록 식미는 좋을 것으로 예상할 수 있겠다. 또한 식미치와 단백질 함량 및 미량원소 Ca와는 부의 상관성을 나타내어 이들 성분들은 영양적으로 우수하나 식미에는 좋지 않은 영향을 미칠 것으로 생각된다. 호화특성과 식미와의 상관관계에서는 RVA의 호화온도, DSC의 호화개시, 호화피크, 호화종료 온도, 호화엔탈피와는 부의 상관관계를 나타내었다. 쌀가루 및 쌀전분 65°C에서의 팽윤력이 높을수록, 즉 호화시 수화초기에 물과의 결합력이 좋을수록 식미와는 정의 상관을 나타내고 있음을 알 수 있었으며 취반 후 밥의 물성 특성인 씹힘성과 식미와는 정의 상관성을 보였다.

Table 4-32. Correlation coefficients and relevant characters of among properties of rice endosperm components

		Relevant characters	Correlation coefficient
Palatability value	Sensory evaluation	Glossiness	0.95**
		Nutty roasted taste	0.95**
		Cohesiveness	0.94**
		Overall preference	0.94**
	Non-starch lipid	Stearic acid, C _{18:0}	-0.61*
	Starch lipid	Linoleic acid, C _{18:2}	0.63*
		Arachidic acid, C _{20:0}	-0.61*
	Phytosterols	Squalene	0.66*
		Cycloartenol	0.60*
		Protein content	-0.94**
	RVA measurement	Ca	-0.62*
		Pasting temp. (°C)	-0.85**
	DSC characteristics	T _o (°C)	-0.76**
		T _p (°C)	-0.81**
T _c (°C)		-0.83**	
ΔH(J/g)		-0.68*	
Flours	Swelling power at 65°C	0.79**	
Starches	Swelling power at 65°C	0.77**	
Texture properties	Gumminess	0.68*	
	Chewiness	0.58*	

*, ** : Significant at 5% and 1% level, respectively.

(10) 쌀 배유 지용성 성분과 호화특성간의 상관관계

쌀 함유 지용성 성분과 호화 특성간의 상관관계를 Table 4-33에 나타내었다.

우선, 수화초기(55°C, 65°C) 쌀가루 팽윤력은 전분지질의 linoleic acid와 정의 상관관계를 나타내었으며 85°C에서의 팽윤력의 경우 linoleic acid와는 부의 상관성을, palmitic acid와는 정의 상관관계를 나타내었다. 쌀가루 95°C 팽윤력에서는 비전분 지질 지방산 조성 oleic acid와 정의 상관관계를, linoleic acid와는 부의 상관관계를 나타내었다. 전분의 팽윤력에서는 55°C~75°C까지 전분지질 지방산 조성 linoleic acid와는 정의 상관관계를, stearic, arachidic acid와는 부의 상관관계를 보였으며 이들 전분 지질 지방산 조성들이 호화 초기 팽윤력에 관여하고 있음을 알 수 있었다. 전분의 85°C 팽윤력에서는 palmitic acid와 정의 상관관계를 나타내어 쌀가루 및 전분의 팽윤력에는 비전분 지질보다 전분지질의 지방산 조성들이 영향을 미치며 특히, linoleic acid는 팽윤력에 관여하는 주요 지방산임을 알 수 있었다.

쌀가루의 RVA 호화특성과 지용성 성분 간의 상관관계에서는 호화개시온도는 전분지질 지방산 조성 중 linoleic, stearic acid와 cycloartenol과는 부의 상관 관계를, arachidic acid와는 정의 상관관계를 나타내었다. 또한 linoleic acid는 breakdown과는 부의 상관관계를, setback과는 정의 상관성을 나타내었다.

DSC 호화특성에서 호화개시, 호화피크, 호화종료, 호화엔탈피 모두에서 linoleic acid와는 부의 상관성을 나타내어 전분지질의 주요 구성 지방산으로 linoleic acid 비율이 많을수록 호화에도 바람직한 영향을 미치고 있음을 시사하는 결과라고 볼 수 있겠다. 구성 지방산 중 사슬길이가 긴 포화지방산인 stearic, arachidic acid와는 DSC 호화특성과 정의 상관관계를 나타내었다. 이상의 결과로부터 전분 함유 지질은 비록 적은 양일지라도 전분지질 구성 지방산 조성에 따라 호화특성에 다르게 관여하고 있음을 시사하는 결과라고 할 수 있겠다.

Table 4-33. Correlation coefficients between lipid components of rice endosperm and pasting properties

		Relevant characters		Correlation coefficient	
Flours	SP at 55°C	Starch lipid	Linoleic acid, C _{18:2}	0.67*	
			Phytosterol	24-Methyl-cycloartanol	-0.59*
	SP at 65°C	Starch lipid	Stearic acid, C _{18:0}	-0.69*	
			Linoleic acid, C _{18:2}	0.75**	
			Arachidic acid, C _{20:0}	-0.79**	
			Linolenic acid, C _{18:3}	-0.61*	
	SP at 75°C	Phytosterol	24-Methyl-cycloartanol	-0.59*	
			Starch lipid	Palmitic acid, C _{16:0}	0.59*
	SP at 85°C	Starch lipid		Linoleic acid, C _{18:2}	-0.64*
			SP at 95°C	Non-starch lipid	Oleic acid, C _{18:1}
	Linoleic acid, C _{18:2}	-0.61*			
	Starches	SP at 55°C	Phytosterol	24-Methyl-cycloartanol	-0.63*
Starch lipid				Stearic acid, C _{18:0}	-0.64*
				Oleic acid, C _{18:1}	-0.67*
				Linoleic acid, C _{18:2}	0.83**
		Arachidic acid, C _{20:0}	-0.63*		
SP at 65°C		Starch lipid	Stearic acid, C _{18:0}	-0.69*	
			Oleic acid, C _{18:1}	-0.64*	
			Linoleic acid, C _{18:2}	0.86**	
			Arachidic acid, C _{20:0}	-0.75**	
SP at 75°C		Starch lipid	Stearic acid, C _{18:0}	-0.84**	
			Linoleic acid, C _{18:2}	0.67**	
			Arachidic acid, C _{20:0}	-0.78**	
SP at 85°C		Starch lipid	Palmitic acid, C _{16:0}	0.78**	

SP : swelling power

*, ** : Significant at 5% and 1% level, respectively.

		Relevant characters		Correlation coefficient	
RVA measurement	Pasting temp.(°C)	Starch lipid	Linoleic acid, C _{18:2}	-0.83*	
			Arachidic acid, C _{20:0}	0.79**	
			Stearic acid, C _{18:0}	-0.61*	
		Phytosterol	Cycloartenol		-0.60*
	Peak			Starch lipid	Stearic acid, C _{18:0}
		Oleic acid, C _{18:1}	0.67*		
		Arachidic acid, C _{20:0}	0.66*		
	Trough	Starch lipid	Myristic acid, C _{14:0}	0.66*	
			Oleic acid, C _{18:1}	0.59*	
	Final	Starch lipid	Myristic acid, C _{14:0}	0.71**	
			Palmitic acid, C _{16:0}	-0.59*	
	Breakdown	Starch lipid	Stearic acid, C _{18:0}	0.64*	
			Linoleic acid, C _{18:2}	-0.68*	
			Arachidic acid, C _{20:0}	0.67*	
	Setback	Starch lipid	Palmitic acid, C _{16:0}	-0.64*	
			Stearic acid, C _{18:0}	-0.62*	
Linoleic acid, C _{18:2}			0.73**		
Arachidic acid, C _{20:0}			-0.63*		
DSC characteristics	T _o (°C)		Stearic acid, C _{18:0}	0.73**	
			Linoleic acid, C _{18:2}	-0.86**	
			Arachidic acid, C _{20:0}	0.77**	
	T _p (°C)	Phytosterol	24-Methyl-cycloartanol		0.59*
				Starch lipid	Stearic acid, C _{18:0}
			Linoleic acid, C _{18:2}		-0.86**
			Arachidic acid, C _{20:0}	0.76**	
	T _c (°C)	Phytosterol	Cycloartenol		-0.59*
				24-Methyl-cycloartanol	0.66*
		Starch lipid	Stearic acid, C _{18:0}	0.59**	
			Oleic acid, C _{18:1}	0.64*	
			Linoleic acid, C _{18:2}	-0.86**	
	ΔH(J/g)	Starch lipid	Arachidic acid, C _{20:0}	0.65*	
			Oleic acid, C _{18:1}	0.73**	
			Linoleic acid, C _{18:2}	-0.79**	

라. 저장에 따른 쌀 배유 이화학적 특성 변화

(1) 식미 차이가 두드러진 2 품종의 저장에 따른 배유 성분 변화

(가) 저장에 따른 식미치 변화

식미에서 두드러진 차이를 나타내는 고품과 팔공 두 품종의 쌀을 현미상태로 30℃에서 3개월간 저장 후 토요식미계로 식미치를 각각 측정함으로써, 저장에 따른 식미치의 변화 정도를 비교하였다(Fig. 4-14). 쌀에 함유되어 있는 단백질, 아밀로오스, 수분함량을 각각 분석하고, 이들의 함량에 근거하여 식미 반영 점수를 환산하여 식미치로써 표시하도록 고안된 토요식미기 측정치에 의하면 고품은 76.5, 팔공은 66.0으로 품종 간에 두드러진 차이가 있음을 확인할 수 있다. 이들을 30℃에서 3개월간 저장함에 따라 식미치는 고품 67.3, 팔공 59.8로 각각 유의적으로 저하됨을 알 수 있다.

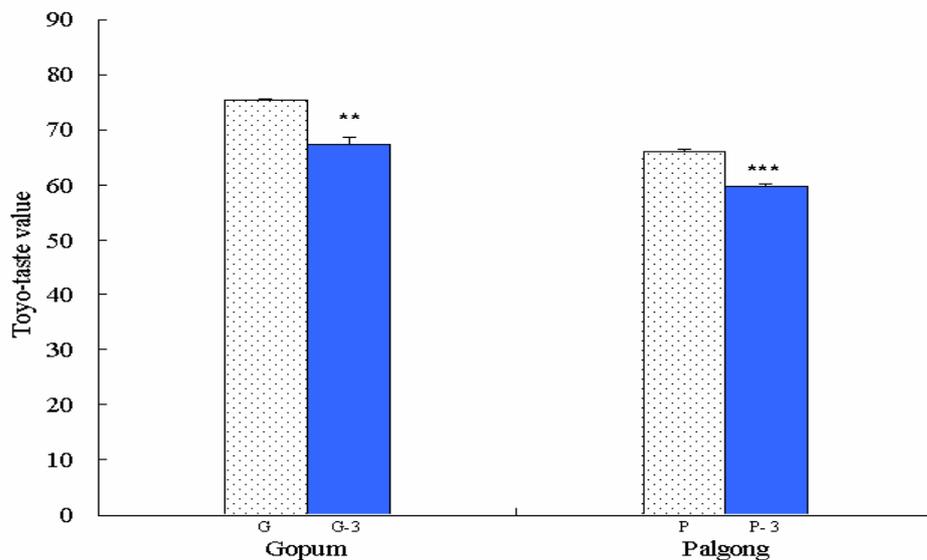


Fig. 4-14. Palatability score of cooked rice by the Toyo taste meter during storage.

G: Gopumbyeo, P: Palgongbyeo, The number are storage months,

** , *** : significant at 1% and 0.1% level by T-test value.

(나) 저장에 따른 유리 지방산 조성 변화

취반 후 식미와 상관성이 있는 윤기 및 구수한 냄새의 원인 물질은 지질 성분이므로, 품종 및 저장에 따른 지질 함량 변이를 각각분석 비교하였다(Table 4-34). 두 품종의 쌀들로부터 각각 배유에 함유되어 있는 지방산으로써 myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidic acid, gadoleic acid를 분리할 수 있었으며, 이들 지방산의 함량 조성비가 가장 큰 지방산은 두 품종 모두 linoleic acid였으며, 이어서 oleic acid, palmitic acid의 순이었다. 그리고 이들 총 지방산들의 조성비는 두 품종 간에 각각 차이가 있었으며, 탄소수가 동일한 지방산의 경우에서 고품이 팔공보다 불포화지방산인 linoleic acid의 함량비가 높았으며 배유에 함유되어 있는 불포화 지방산의 함량은 식미와 연관성이 있음을 예상할 수 있었다. 이러한 유리지방산의 저장(3개월)에 따른 조성 변화를 보면

palmitic acid(C_{16:0}), linoleic acid(C_{18:2})는 감소하고 oleic acid(C_{18:1}), arachidic acid(C_{20:0})등 그 외 지방산 조성비는 증가하는 경향을 나타내었다. 조성비에서 함량이 높은 양질의 불포화지방산인 linoleic acid와 oleic acid의 조성비에서 차이가 있어, oleic acid은 고품(36.45%)과 팔공(40.13%)이 각각 41.75%, 42.21%로 증가하였으며 linoleic acid은 고품(40.55%), 팔공(38.91%)이 각각 35.92%, 35.80%로 유의적인 감소를 보였다.

Table 4-34. Changes of fatty acid composition of total lipid in milled rice during storage

Fatty acid composition	Gopumbyeo		Palgongbyeo	
	0	3 ¹⁾	0	3
Lipid content (%)	0.89±0.01 ²⁾	0.53±0.03 ^{***3)}	0.87±0.06	0.43±0.02 ^{***}
Myristic acid, C _{14:0}	0.38±0.15	0.40±0.26	0.33±0.09	0.57±0.03 [*]
Palmitic acid, C _{16:0}	18.50±1.38	16.19±0.32	16.70±0.49	16.10±0.30
Palmitoleic acid, C _{16:1}	0.12±0.09	0.16±0.00	0.08±0.06	0.15±0.02
Stearic acid, C _{18:0}	2.19±0.72	2.76±0.34	1.95±0.22	2.46±0.32
Oleic acid, C _{18:1}	36.45±2.04	41.75±0.76 [*]	40.13±1.83	42.21±0.35
Linoleic acid, C _{18:2}	40.55±2.12	35.92±0.52 [*]	38.91±1.15	35.80±0.36 [*]
Linolenic acid, C _{18:3}	1.15±0.13	1.49±1.11 [*]	1.16±0.05	1.66±0.06 ^{**}
Arachidic acid, C _{20:0}	0.40±0.09	0.74±0.26	0.41±0.08	0.49±0.06
Gadoleic acid, C _{20:1}	0.26±0.06	0.60±0.02 ^{**}	0.33±0.07	0.56±0.01 ^{**}
Total saturated (SFA)	21.47	20.08	19.39	19.62
Total unsaturated (USFA)	78.53	79.92	80.61	80.38

1) Storage time(months).

2) Values are means ± standard deviations.

3) *, **, *** significant at 5%, 1%, 0.1% level by T-test value.

(다) 저장에 따른 지질관련 효소 활성도 변이

쌀은 수확 후, 저장기간이 길어질수록 열화되어 묵은쌀 냄새를 발생시킨다. 이러한 일련의 과정에 쌀에 함유되어 있는 지질이 영향을 받아 그 결과 식미가 저하되는 등 이른바 고미화가 진행된다. 쌀에 함유되어 있던 지질은 lipase에 의해서 지방산으로 분해되고, 이들 중 유리상태의 불포화 지방산 특히 linoleic acid 등은 lipoxygenase의 작용을 받아 과산화물을 형성하고, 최종적으로는 묵은쌀 냄새의 원인이 되는 휘발성 화합물로 변환된다(Piggott *et al.*, 1991, Pomeranz Y 1992). 본 논문에서 저장에 따른 식미치 저하 정도가 고품은 -8.2, 팔공은 -6.2로써 밥맛이 좋은 쌀 식미치 저하의 폭이 오히려 크게 나타났다(Fig. 4-15).

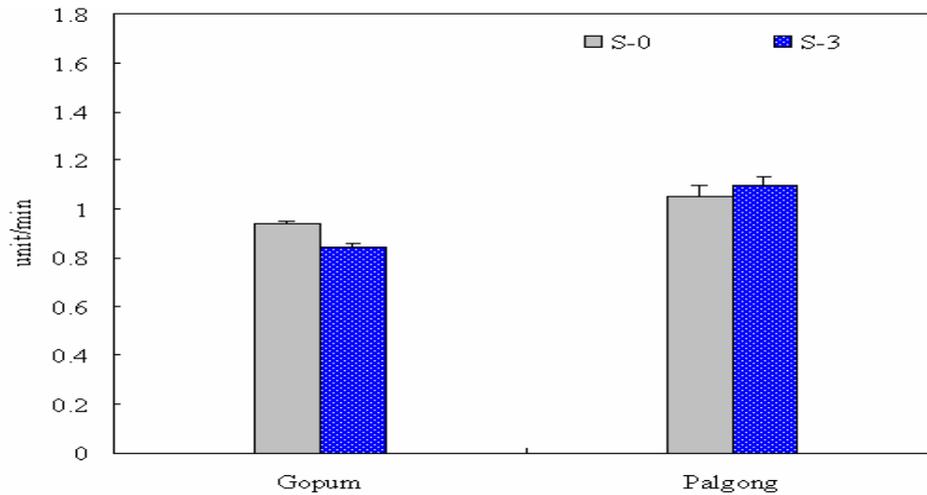


Fig. 4-15. Changes of lipase activity in rice bran during storage.

S-0: not stored, S-3: stored for 3 months.

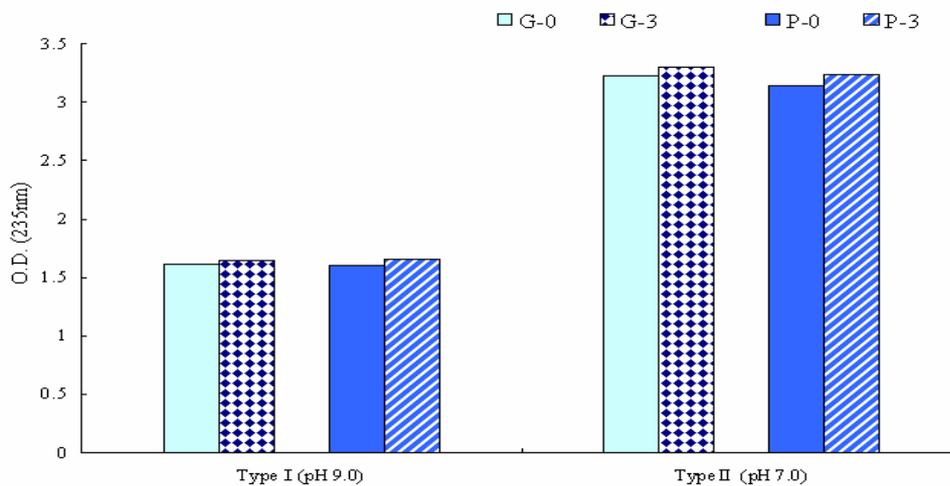


Fig.16. Changes of Type 1(pH 9.0) and Type 2(pH 7.0) lipoxygenase activity of rice bran during storage.

G: *Gopumbyeo*, P: *Palgongbyeo*, The number are storage months.

이는 쌀에 함유되어 있는 전분 외의 다른 성분 중 지용성 성분들의 열화에 기인하는 것이리라 사료된다. 그러므로 쌀의 식미를 개선시키는 고 식미 쌀의 분자유종을 고려할 때, 지질관련 효소 활성도의 조절을 통한 변이 유발에 대한 검토도 필요할 것이다. 또한 저장에 따른 식미치의 열화는 지질관련 효소들의 활성과 연관이 있으리라 사료되어 고품과 팔공 각각의 현미 및 3개월간 저장한 현미로부터 lipase 및 lipoxygenase 조효소 분획을 제조하여 저장에 따른 이들의 효소의 활성도 변이를 검토하였다. Fig. 4-16에서 알 수 있듯이 lipase의 활성은 고품보다 팔공이 높았으며 고품의 경우에는 3개월 저장후의 활성이 저장 전보다 약간 낮아졌음에 비해서 팔공의 경우에는 오히려 증가하였다. 결국 식미의 열화요인이 될 수 있는 lipase의 활성은 식미가 나쁜 품종인 팔공이 높은 것을 알 수 있어, 고 식미 쌀 개발을 위한 분자 육종 시 lipase의 변환에 대한 검토의 필요성을 제시하는 결과를 얻었다. 한편, linoleic acid 등 유리상

태의 불포화 지방산의 과산화 반응에 관여하는 lipoxygenase의 활성은(Fig. 4-16) Type I 과 Type II 모두 고품과 팔공 두 시료에서 유의미한 차이를 나타내지 않았으며, 저장에 따른 활성도의 변화에서도 유의미한 차이를 나타내지 않았다.

(라) 신속점도계에 의한 호화특성 변화

취반에 따른 쌀 배유 성분들의 이화학적 특성 중 호화특성은 쌀의 식미특성을 잘 반영하는 지표이다. 즉 호화란 쌀 배유의 주성분인 전분에 물이 첨가되어 열이 가해짐으로써 나타나는 전분분자의 재배열의 결과이며 취반 물성에 가장 큰 영향을 미치는 대표적인 물성이다. 이에 식미에 차이가 있는 쌀의 저장에 따른 호화특성 변화를 비교하였다. 고품과 팔공 각각의 쌀가루를 신속 점도계(Rapid Visco Analyzer)를 이용하여 호화특성을 분석한 결과(Table 4-35), 호화개시온도는 고품(69.8°C)이 팔공(72.7°C)보다 낮았으며, 고품은 저장에 따른 호화 개시온도의 변화가 없는데 비해서 팔공은 호화 개시온도의 증가를 보였으나 유의적인 변화는 없었다. 또한 최고점도는 두 품종 모두 저장에 따라 유의적으로 증가하였는데, 현미와 백미는 저장에 따라 호화개시온도는 변함이 없고 최고점도는 증가하였다는 보고(Cho & Kim, 1990)와 일치하였다. Yasumatsu *et al.* (1964)은 저장 중 중성지방의 가수분해에 의해 유리지방산이 생성되어 쌀 전분의 팽윤현상이나 호화작용을 억제하기 때문에 최고점도가 증가하였다고 보고하였다. 강하점도(breakdown, 최고-최저점도)의 값은 팽윤된 전분입자의 물성을 나타내는 것으로써, breakdown 값이 낮을수록 전분입자가 호화되어 팽윤된 후에도 입자가 붕괴되지 않고 어느 정도 입자의 형태를 유지할 수 있음을 의미하는 것으로써 식미감으로는 바람직한 물성이다. 고품이 팔공보다 breakdown 수치는 낮지만 유의적인 차이는 없었다. 한편, 저장 기간이 증가함에 따라 breakdown 값은 두 품종 모두 유의적으로 증가하였다.

Table 4-35. Changes of pasting properties of rice flours by rapid visco-analyzer during storage

Variety	Storage time (months)	Pasting Temp. (°C).	Viscosity				
			Peak	Trough	Final	Breakdown	Setback
Gopumbyeo	0	69.83 ¹⁾	2708.67	1762.00	2822.33	946.67	113.67
	3	69.67	3518.67***	1991.33*	3291.67***	*1527.33*	-227.00***
Palgongbyeo	0	72.77	2622.67	1638.67	2723.00	984.00	100.33
	3	73.68	3309.00**2)	1830.00***	3233.67***	*1479.00*	-75.33

¹⁾ Results are means of triplicate determinations.

²⁾ *, **, *** significant at 5%, 1%, 0.1% level by T-test value.

(마) X-ray 회절 양상의 변화

이러한 호화특성에는 구성 전분분자의 결정화도 또한 영향을 미칠 것이라 사료되어, 쌀 품종 및 저장에 따른 배유 전분의 X-선 회절도를 측정 비교하였다(Fig. 4-17). 일반적으로 X-선 회절도의 peak가 날카로울수록 결정화도가 크다는 것을 의미하며 고품, 팔공 품종 모두 피크가 회절각도(2θ) 15~16°, 17~18°, 22~23° 근처에서 나타나는 전형적인 A형이었다. 두 품종간의 결정강도에는 차이가 없으나, 저장에 따라 고품과 팔공 전분 모두 peak의 변화를 보여, 저장기간이 길수록 결정화도는 낮아지고 있었다.

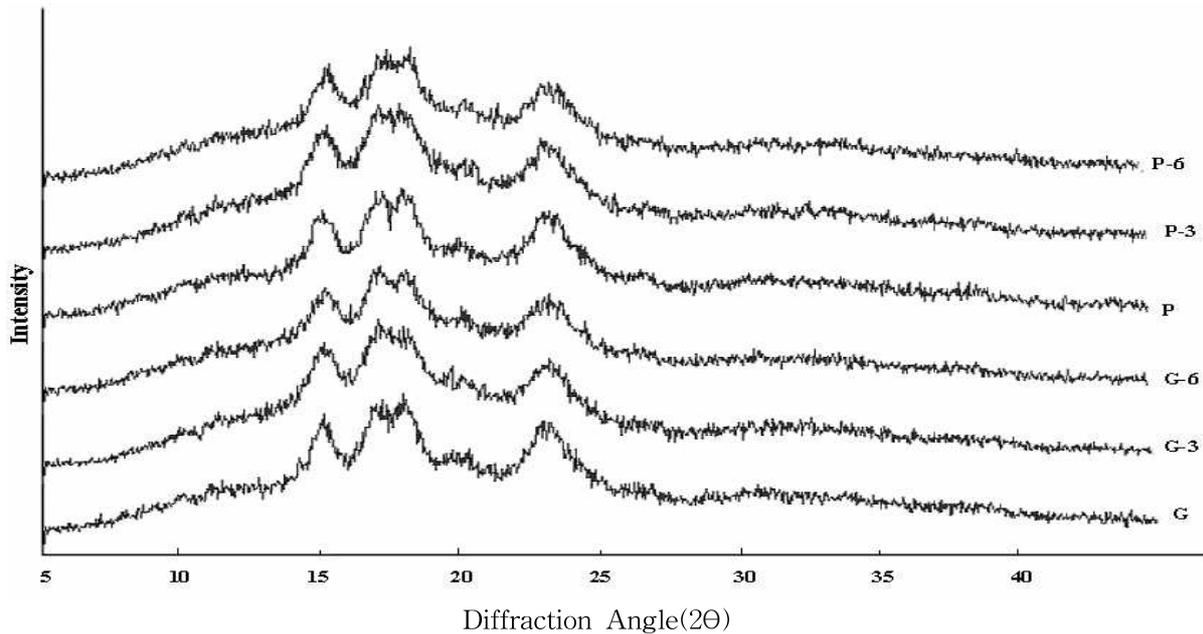


Fig. 4-17. Changes of X-ray diffractograms of rice starches during storage.

G: *Gopumbyeo*, P: *Palgongbyeo*, The number are storage months.

(바) 저장에 따른 아미노산 조성 변화

쌀은 밀이나 옥수수에 비해 lysine, tryptophan, valine, arginine 등의 아미노산 조성이 우수하며 glutamic acid, aspartic acid, arginine의 함량이 많을수록 밥맛이 좋고, threonine, proline의 함량이 많을수록 밥맛이 나쁘다는 선행연구들이 있다. 고품에 함유되어 있는 아미노산의 함량 조성은 Glu(125.53 ng/mg) > Asp(79.82 ng/mg) > Asn(70.04 ng/mg)의 순이었고, 팔공은 Glu(99.50 ng/mg) > Asn(81.50 ng/mg) > Asp(69.29 ng/mg) 순이었다. 특히 밥맛에 좋은 영향을 미치는 aspartic acid의 함량은 고품이 팔공 보다 10.53 ng/mg 많았다. 한편, 3개월 동안 저장함에 따라 고품에 함유되어 있는 아미노산의 함량 조성은 Glu(114.77 ng/mg) > Asp(57.55 ng/mg) > Asn(48.84 ng/mg) 순이었고, 팔공은 Glu(79.35 ng/mg) > Asn(55.17 ng/mg) > Asp(42.21 ng/mg) 순이었다. lysine의 함량 조성은 고품과 팔공 품종 모두 저장에 따라 현저히 낮아졌다. 그리고 고품에 함유되어 있는 아미노산 중 glutamine은 저장 3개월 후에 증가함을 보였으나 두 품종 모두에서 저장에 따라 lysine의 함량 조성은 현저히 낮아졌고 그 외 aspartic acid, glutamic acid, asparagine, serine 등의 조성 함량은 감소하였다(Table 4-36).

Table 4-36. Changes of amino acid composition in milled rice varieties during storage

(unit: ng/mg)

Amino acid	Gopumbyeo		Palgongbyeo	
	0	3 ²⁾	0	3
Aspartic acid	79.821)	57.55	69.29	42.21
Glutamic acid	125.53	114.77	99.50	79.35
Arginine	18.83	7.97	22.23	9.31
Asparagine	70.04	48.84	81.50	55.17
Serine	16.70	10.41	18.62	14.67
Glutamine	17.44	19.29	28.50	8.71
Glycine	9.78	8.42	10.63	11.43
Histidine	5.48	1.64	5.85	1.68
Alanine	19.33	14.03	16.04	20.36
Tyrosine	4.95	2.83	5.86	3.91
Valine	4.53	3.50	5.87	4.64
Methionine	2.12	1.35	2.20	1.99
Cystine	0.44	-	0.55	-
Isoleucine	2.90	2.65	2.60	2.56
Leucine	3.20	3.10	3.39	3.21
Phenylalanine	5.58	2.67	5.80	2.98
Tryptophan	12.32	5.75	14.00	5.26
Lysine	40.73	2.71	46.88	3.49
Threonine	25.34	6.07	23.68	4.77
Proline	15.03	7.83	13.60	10.42
Total	480.09	321.38	476.59	286.12

¹⁾ Results are means of triplicate determinations.

²⁾ Storage time(months).

(2) 저장에 따른 7품종 쌀 배유 지용성 성분 및 소화 특성 변화

(가) 저장에 따른 식미 변화

쌀은 저장 중 물리화학적 변화로 노화가 시작되고 이에 따라 취반미의 품질이 저하되고 가공적성 및 식미 등이 감소하게 된다(Kim & Ahn, 1997). 식미에서 차이를 나타내는 7품종 쌀은 저장 전 식미치에서 품종 간 유의적인 차이를 보였다. 또한 30℃에서 3개월간 저장 후 저장에 따른 식미치 변화를 보면(Fig. 4-18) 모든 품종에서 식미치는 감소하였으며 특히 식미가 나쁜 팔공의 경우 66.03에서 59.80으로 $p < 0.001$ 수준에서 유의적으로 가장 큰 감소를 보였다.

저장함에 따라 전분이 복합 미세 입자간 결합력을 증가시켜 취반시 전분입자의 팽윤을 억제하고 또한 지방의 가수분해에 의한 지방산화로 지방산이 아밀로오스와 결합하여 복합체를 형성함으로써 전반적인 조직감의 저하 및 식미가 저하되는 것으로 생각된다.

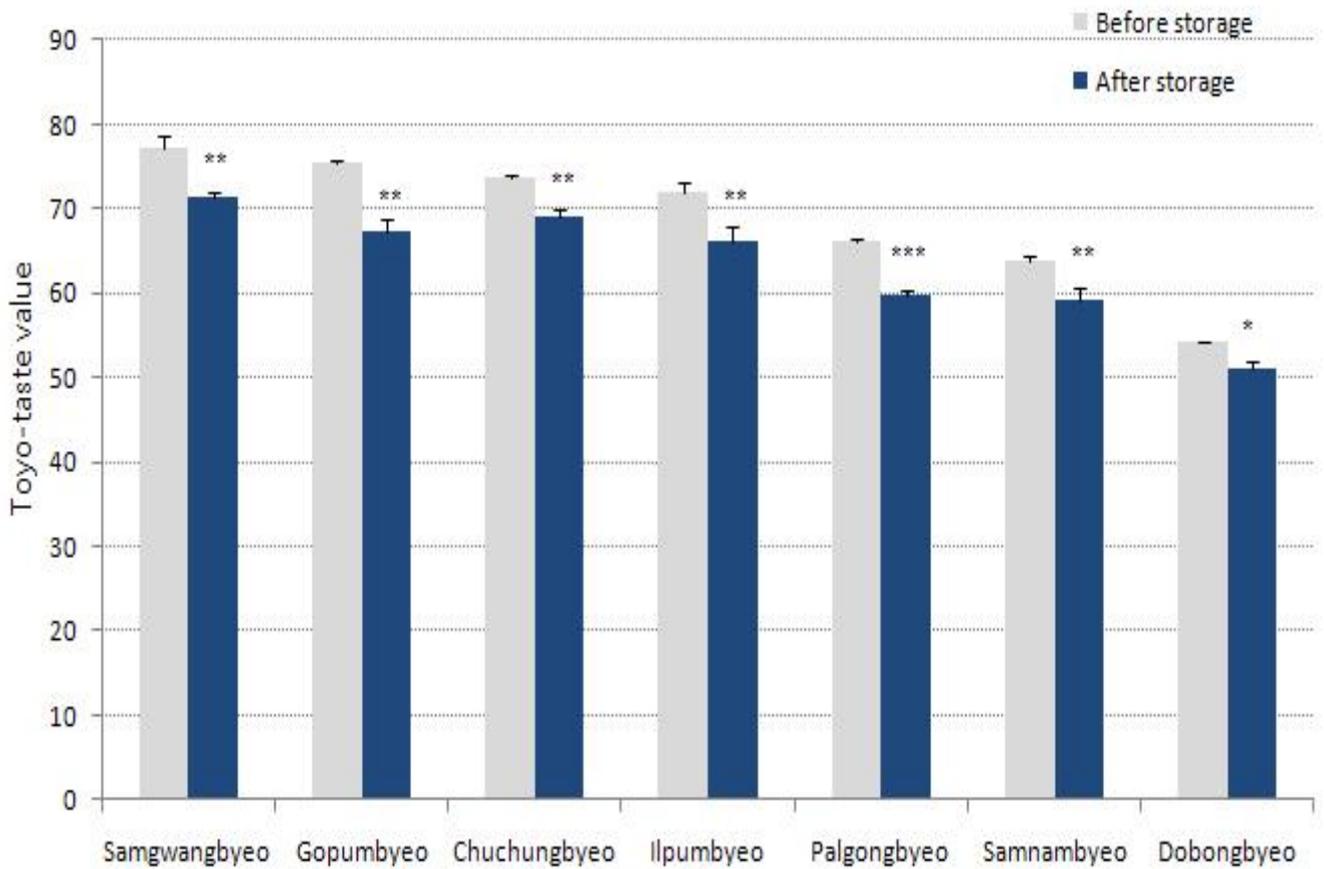


Fig. 4-18. Changes in palatability score of cooked rice by the Toyo taste

*,**,*** significant at 5%,1%,0.1% level by T-test value

(나) 저장에 따른 쌀 배유 유리지질 함량 및 지방산 조성 변화

저장에 따른 쌀의 변화는 지방, 단백질, 전분 기작이 제안되는데 특히 저장 중 지방질의 가수분해로 생성된 유리지방산이 생성되고 지방의 산화에 의해 또 다른 유리지방산들이 생성되며 이러한 변화는 주로 쌀의 외곽층에서 가장 활발하게 일어난다고 한다(Nishiba et al., 2000). 또한 지방산이 아밀로오스와 복합체를 형성하여 전분의 용해도와 팽윤력을 감소시키고 더 나아가 불포화지방산의 자동산화에 의해 형성된 지질산화물과 단백질과의 결합으로 단백질 용해도 또한 감소되므로(Shin et al., 1985) 식미가 저하된다. 품종 및 저장에 따른 쌀 배유 비전분 지질인 유리지질의 저장에 따른 변화를 비교하였다(Table 4-37). 식미에 차이가 있는 7 품종 쌀의 유리지질 함량은 0.87~1.40%을 나타내었으며 모든 품종에서 저장에 따라 0.43~1.05%로 유의적인 감소를 보였다. 쌀은 장기저장에 의해 과산화물가가 증가하고 고미취의 주성분인 카르보닐 화합물이 증가하는 것으로 알려져 있으며 쌀 배유 유리지질은 감소되고 아밀로오스와 결합하고 있는 전분지질 함량이 증가했다는 보고와는 일치하였다(Kato et al., 1983). 쌀에 함유된 유리지질의 저장에 따른 지방산 조성 변화에서는 Myristic(C14:0), palmitoleic(C16:1), oleic acid(C18:1)는 증가하는 경향을 보였고 linoleic acid(C18:2)는 감소하는 경향을 나타내었다.

(다) 저장에 따른 쌀 배유 전분지질(starch-lipid) 함량 및 지방산 조성 변화

쌀 지방 함량은 매우 적으나 쌀의 저장기간 동안 쌀의 변패로 인하여 품종이 다른 취반미에 차이가 있는 것은 지방의 차이 혹은 그 변화에 기인한다고 볼 수 있다. 저장에 따른 쌀의 비전분지질인 유리지질 함량의 감소 및 지방산 조성 변화를 확인 할 수 있었으며(Table 4-38) 이에 식미가 다른 7품종 쌀의 저장에 따른 전분지질 함량 및 지방산 조성 변화를 비교하였다. 전분지질 함량은 저장에 따라 약간 증가하는 경향을 보였는데 식미가 우수한 고품, 추청의 경우는 유의적으로 증가함을 나타내었다. 저장에 따른 전분지질의 지방산 조성의 변화에서는 가장 큰 조성 비율을 차지하였던 palmitic acid는 모든 품종에서 증가하는 양상을 보였으며 특히 식미가 우수한 삼광의 경우 42.06%에서 46.73%로 $p < 0.001$ 수준에서 유의적인 증가를 나타내었다. 또한 식미와 연관성이 기대되는 linoleic acid의 조성비는 저장에 따라 추청, 팔공 품종을 제외한 나머지 품종 모두에서 감소하였으며 고식미 품종은 삼광, 저식미 품종에선 삼남, 도봉 품종이 유의적인 감소를 보였다. 지방산 조성 중 미량함유 조성비를 나타내는 C:18 이상인 stearic, linolenic, arachidic, gadoleic acid는 모든 품종에서 감소함을 보였다. 쌀의 지질은 1% 내외의 소량이지만 취반미의 특성 및 저장에 따른 식미에 영향을 주는 간과할 수 없는 요인이라 할 수 있겠다.

Table 4-37. Changes in fatty acid composition of total lipids in milled rice varieties during storage

Variety	Storage months	Lipid content (%)	Fatty acid composition (%)								
			Myristic acid, C _{14:0}	Palmitic acid, C _{16:0}	Palmitoleic acid, C _{16:1}	Stearic acid, C _{18:0}	Oleic acid, C _{18:1}	Linoleic acid, C _{18:2}	Linolenic acid, C _{18:3}	Arachidic acid, C _{20:0}	Gadoleic acid, C _{20:1}
Samgwangbyeo	0	1.11 ^b	0.28 ^{1)a}	18.78 ^{c2)}	0.05 ^{ab}	1.56 ^a	38.83 ^b	38.58 ^{abc}	1.18 ^d	0.48 ^{ab}	0.25 ^a
	3	0.88 [*]	0.32	19.05	0.11	1.55	39.30 [*]	37.93	1.08 [*]	0.42	0.27
Gopumbyeo	0	0.89 ^a	0.38 ^{ab}	18.50 ^c	0.12 ^b	2.19 ^b	36.45 ^a	40.55 ^d	1.15 ^d	0.40 ^a	0.26 ^a
	3	0.53 ^{***}	0.40	16.19	0.16	2.76	41.75 [*]	35.92 [*]	1.49 [*]	0.74	0.60 ^{**}
Chuchungbyeo	0	1.06 ^b	0.27 ^a	18.21 ^{bc}	0.02 ^a	1.62 ^a	38.73 ^b	39.44 ^{cd}	0.96 ^{ab}	0.46 ^a	0.30 ^a
	3	0.71 ^{***}	0.31 ^{**}	19.94 [*]	0.11 ^{**}	1.50 ^{**}	39.01	37.69 ^{**}	0.92 [*]	0.37 [*]	0.16 ^{***}
Ilpumbyeo	0	1.25 ^c	0.25 ^a	16.02 ^a	0.02 ^a	1.47 ^a	43.42 ^c	36.77 ^a	1.03 ^{bc}	0.57 ^{bc}	0.46 ^b
	3	0.85 ^{**}	0.34 ^{***}	18.55 ^{**}	0.11 ^{***}	1.71 ^{**}	41.65	35.93	1.00	0.51 [*]	0.23 ^{**}
Palgongbyeo	0	0.87 ^a	0.33 ^{ab}	16.70 ^a	0.08 ^{ab}	1.95 ^{ab}	40.13 ^b	38.91 ^{bcd}	1.16 ^d	0.41 ^a	0.33 ^a
	3	0.43 ^{***}	0.57 [*]	16.10	0.15	2.46	42.21	35.80 [*]	1.66 ^{**}	0.49	0.56 ^{**}
Samnambyeo	0	1.40 ^d	0.30 ^{ab}	17.04 ^{ab}	0.02 ^a	1.43 ^a	40.67 ^b	38.53 ^{abc}	1.11 ^{cd}	0.46 ^a	0.44 ^b
	3	0.80 ^{***}	0.38 [*]	18.08 [*]	0.11 ^{***}	0.87 ^{**}	41.28 ^{**}	37.38 [*]	1.11	0.48	0.32 ^{**}
Dobongbyeo	0	1.24 ^c	0.41 ^b	18.47 ^c	0.10 ^{ab}	2.73 ^c	39.12 ^b	37.44 ^{ab}	0.90 ^a	0.59 ^c	0.25 ^a
	3	1.05 [*]	0.52 ^{**}	18.38 ^{**}	0.13	1.55 ^{***}	40.07 [*]	37.63	0.86 [*]	0.59	0.29 [*]

1) Results are means of triplicate determinations

2) Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

3) *, **, *** significant at 5%, 1%, 0.1% level by T-test value

Table 4-38. Changes in fatty acid composition of starch lipids in milled rice varieties during storage

Variety	Storage months	Lipid Content (%)	Fatty acid composition (%)								
			Myristic acid C _{14:0}	Palmitic acid C _{16:0}	Palmitoleic acid C _{16:1}	Stearic acid C _{18:0}	Oleic acid C _{18:1}	Linoleic acid C _{18:2}	Linolenic acid C _{18:3}	Arachidic acid C _{20:0}	Gadoleic acid C _{20:1}
Samgwangbyeo	0	1.13 ^{1)b2)}	1.66 ^a	42.06 ^{cd}	0.04 ^{ab}	3.35 ^{ab}	16.05 ^a	34.77 ^e	1.83 ^{ab}	0.13 ^a	0.11 ^{ab}
	3	1.09	1.68	46.73 ^{***}	0.04	2.86 [*]	15.95	31.78 [*]	0.80	0.07 ^{**}	0.09 ^{**}
Gopumbyeo	0	0.98 ^a	1.66 ^a	38.25 ^a	0.04 ^{ab}	4.48 ^c	20.08 ^{cd}	33.13 ^c	2.02 ^b	0.15 ^a	0.19 ^{ab}
	3	1.19 ^{**3)}	1.62	42.07 [*]	0.04	3.74	19.81	31.76	0.76	0.12	0.08
Chuchungbyeo	0	0.84 ^a	1.57 ^a	44.32 ^e	0.05 ^{bc}	3.85 ^{bc}	16.08 ^a	31.66 ^b	2.25 ^b	0.13 ^a	0.09 ^a
	3	1.14 ^{**}	1.33 [*]	45.03	0.02 [*]	2.44 ^{**}	17.20	33.17	0.66 ^{***}	0.08 [*]	0.06
Ipumbyeo	0	0.92 ^a	2.46 ^b	38.29 ^a	0.07 ^c	4.20 ^{bc}	18.96 ^{bc}	33.41 ^{cd}	2.34 ^b	0.13 ^a	0.14 ^{ab}
	3	1.01	1.71 ^{**}	40.68 [*]	0.03 ^{**}	2.33 [*]	22.03 ^{**}	32.39	0.65 ^{**}	0.10	0.09 [*]
Palgongbyeo	0	0.89 ^a	1.98 ^a	39.75	0.03 ^a	4.30 ^{bc}	20.50 ^{de}	31.93 ^b	1.18 ^a	0.16 ^a	0.18 ^{ab}
	3	1.02	1.72	41.19 [*]	0.03	3.77	20.01	32.29	0.77 [*]	0.12	0.07
Samnambyeo	0	0.88 ^a	1.64 ^a	40.55 ^{ab}	0.07 ^c	2.94 ^a	18.77 ^b	34.52 ^{de}	1.23 ^a	0.13 ^a	0.15 ^{ab}
	3	1.07 [*]	1.82 [*]	46.52 [*]	0.05	2.31 ^{**}	18.58	30.08 ^{**}	0.48 [*]	0.11 [*]	0.05 ^{**}
Dobongbyeo	0	0.84 ^a	1.80 ^a	43.97 ^b	0.07 ^c	6.64 ^d	21.56 ^e	23.90 ^a	1.67 ^{ab}	0.26 ^b	0.13 ^{ab}
	3	0.86	2.23 ^{**}	47.87 [*]	0.03 [*]	4.64	22.82	21.87 ^{**}	0.32 ^{***}	0.15 ^{**}	0.06 ^{***}

1) Results are means of triplicate determinations

2) Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

3) **, *** significant at 5%, 1%, 0.1% level by T-test value

(라) 저장에 따른 식물성 스테롤류(phytosterol) 함량 변화

쌀에 함유되어 있는 식물성 스테롤류의 함량 또한 식미와의 연관성을 있을 가능성을 감안하여 저장에 따른 7품종의 주요 phytosterol 함량 변화를 분석한 결과는 Table 4-39에 나타내었다. 식미가 우수한 품종의 경우 squalene과 cycloartenol의 함량이 높은 경향을 나타내었으며 squalene은 추청을 제외한 모든 품종에서 3개월 저장에 따라 증가하였는데, 특히 식미가 나쁜 팔공, 삼남, 도봉 품종은 저장 전에 비해 유의적으로 증가함을 나타내었다($p < 0.01$). Sitosterol, campesterol은 품종 간 함량 차이를 나타내지만 식미와 연관성은 발견할 수 없었으며 저장에 따라 이들의 함량은 추청을 제외한 모든 품종에서 증가하는 경향을 나타내었다. Stigmasterol의 경우는 식미가 우수한 삼광과 고품 품종, 식미가 나쁜 품종인 팔공, 삼남, 도봉 품종은 저장에 따라 증가하는 경향을 보이는 반면 추청과 일품벼 품종의 경우 저장에 따라 감소 경향을 보였다. 이러한 식물성 스테롤은 저장에 따라 증가하는 양상을 보여 저장에 따른 쌀의 식미 변화에 좋지 않은 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있겠다.

Table 4-39. Phytosterols and squalene composition in rice varieties during storage

Variety	Storage months	Squalene	Phytosterol					($\mu\text{g/g}$ rice)
			Campesterol	Stigmasterol	Sitosterol	Cycloartenol	24-Methyl-cycloartanol	
Samgwangbyeo	0	6.82±0.50 ^{b1)}	18.97±0.60 ^{ab}	15.14±0.56 ^a	58.19±1.51 ^b	21.48±0.37 ^c	13.38±0.37 ^b	
	3	8.71±0.81 ^{*2)}	28.72±0.99 ^{***}	15.83±0.96	68.01±1.65 ^{**}	23.17±1.06	14.03±0.43	
Gopumbyeo	0	15.28±1.11 ^e	18.15±1.29 ^a	15.56±0.60 ^{ab}	50.36±1.75 ^a	27.82±0.55 ^c	11.80±0.66 ^a	
	3	15.41±0.46	33.84±1.00 ^{**}	18.40±0.43 ^{**}	78.96±1.74 ^{***}	22.21±0.75 ^{***}	11.30±0.86	
Chuchungbyeo	0	11.12±0.19 ^d	28.09±0.93 ^e	18.63±0.93 ^c	76.19±1.93 ^d	28.62±1.02 ^e	15.77±0.59 ^d	
	3	10.16±0.73	30.88±1.19 [*]	13.60±0.52 ^{**}	67.70±1.59 [*]	24.61±1.07 ^{**}	13.79±0.96 [*]	
Ilpumbyeo	0	15.88±0.32 ^e	26.07±0.66 ^d	22.40±0.13 ^d	65.45±0.83 ^c	36.99±0.37 ^f	16.35±0.34 ^d	
	3	15.90±0.91	34.24±1.54 ^{**}	20.95±0.95	67.39±1.85	34.44±0.88	21.16±0.85 [*]	
Palgongbyeo	0	6.50±0.29 ^b	20.07±0.47 ^b	16.64±1.03 ^b	52.00±1.00 ^a	15.77±0.34 ^b	14.31±0.28 ^c	
	3	12.44±0.95 ^{**}	22.14±1.04 [*]	21.14±0.78 [*]	76.37±1.43 ^{***}	15.41±1.42	16.78±0.94	
Samnambyeo	0	8.98±0.48 ^c	21.79±0.25 ^c	16.00±0.46 ^{ab}	49.37±1.21 ^a	23.59±1.36 ^d	12.73±0.51 ^b	
	3	11.36±0.55 ^{**}	34.28±1.68 ^{***}	18.70±0.95 [*]	58.27±1.12 ^{**}	26.76±1.68	17.34±1.10 ^{**}	
Dobongbyeo	0	4.99±0.07 ^a	23.04±0.18 ^c	18.87±0.29 ^c	51.63±1.33 ^a	14.47±0.48 ^a	19.32±0.12 ^e	
	3	7.18±0.30 ^{**}	32.87±1.21 ^{**}	19.73±1.55	55.46±1.91	12.48±1.03 [*]	18.91±1.21	

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

^{*}, ^{**}, ^{***} significant at 5%, 1%, 0.1% level by T-test value

(3) 저장에 따른 호화특성 변화

(가) RVA에 의한 호화 특성 변화

RVA에 의한 쌀의 호화에 따른 점도 특성 및 저장에 따른 변화를 분석한 결과는 Table 4-40과 같다. 품종별 저장 전 호화특성에서 호화개시온도는 68.93℃~82.52℃ 범위였고 최고점도는 도봉(3146.0)을 제외한 나머지 품종에서 1993.00~2708.67 범위를 나타내었다. 식미와 연관성이 검토되는 강하점도(breakdown) 중간식미를 가진 일품이 가장 낮았다. 3개월 저장함에 따라 호화개시온도는 유의적인 변화는 없으나 약간 증가하는 양상을 보였다. 증가폭이 크지 않지만 이 같은 결과는 저장 중 지질 가수분해에 의해 유리지방산 생성량이 많아지면서 쌀 전분의 팽윤이나 호화작용을 방해한 것으로 보인다. 특히 식미가 좋지 않은 팔공과 삼남의 호화온도 증가폭이 컸다. 최고점도, 최저점도, 최종점도는 모든 품종에서 저장에 따라 유의적으로 증가하였으며 최고점도가 높을수록 breakdown도 높아지는 경향을 볼 수 있다. 최고점도가 증가되는 것은 저장 중 일어나는 노화에 의한 것으로 저장 전 보다 전분입자의 결합력이 커지면서 팽윤에 대한 저항이 증가되어 나타나는 현상인 것으로 생각된다. 또한 쌀의 저장 중 단백질과 지방의 변화에 의해 전분의 팽윤에 대한 영향이 감소하여 최고점도가 증가한 것으로 여겨지며 쌀 저장 중 쌀가루의 아밀로그래프 호화온도는 크게 변하지 않으나 호화점도는 저장 중 증가한다는 보고(Shin et al., 1985)와 일치하였다. 쌀의 저장 중 지방질로부터 생성된 지방산은 아밀로오스 나선구조 내에 amylose-lipid complex를 형성할 수 있어 입자의 팽창을 저해하며 온도가 증가할수록 complex 구조가 느슨해져 일정온도에 도달하면 전분 입자가 팽윤하기 시작하며 최고점도가 증가하는 것은 유리지방산 또는 α -amylase 감소에 의한 것으로 여겨진다. 한편, Shoji & Kurasawa (1981)는 쌀의 저장 중 단백질과 지방의 변화로 전분의 팽윤에 대한 영향이 감소하여 최고점도가 증가되나 장기저장의 경우에는 성분의 변화 외에도 전분 자체의 변화에 의하여 최고점도가 오히려 감소된다고 보고하였다. 호화 중 열과 전단(shear)에 대한 저항성을 나타내는 breakdown (granule 붕괴나 paste의 안정성에 관계되는 수치) 또한 저장함에 따라 모든 품종에서 증가함을 보였다. 전분의 노화도를 나타내는 setback은 다른 품종에 비해 고품과 도봉이 유의적으로 감소하였다.

Table 4-40. Changes in pasting properties of seven rice varieties by rapid visco-analyzer during storage

Variety	Pasting Temp. (°C)		Viscosity (CP)									
			Peak		Trough		Final		Breakdown		Setback	
	0	3 ¹⁾	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3
Samgwangbyeo	70.23 ^b	70.47 ^{ns}	2386.3 ^b	3561.3 ^{***}	1582.3 ^b	2098.6 ^{**}	2639.0 ^{cd}	3708.6 ^{***}	804.0 ^{bc}	1462.6 ^{**}	252.6 ^d	147.3 ^{ns}
Gopumbyeo	69.83 ^b	69.67 ^{ns}	2708.6 ^c	3518.6 ^{***}	1762.0 ^{cd}	1991.3 [*]	2822.3 ^e	3291.6 ^{***}	946.6 ^e	1527.3 ^{**}	113.6 ^b	-227.0 ^{***}
Chuchungbyeo	69.75 ^b	69.13 ^{ns}	2003.6 ^a	3283.0 ^{**}	1265.3 ^a	1987.0 ^{**}	2201.0 ^b	3514.6 ^{***}	738.3 ^b	1296.0 ^{**}	197.3 ^c	231.6 ^{ns}
Ilpumbyeo	68.93 ^a	69.18 ^{ns}	2632.0 ^c	3385.3 ^{***}	2131.0 ^e	2440.0 [*]	3178.0 ^f	3945.0 ^{***}	501.0 ^a	945.3 ^{**}	546.0 ^e	559.6 ^{ns}
Palgongbyeo	72.77 ^c	73.68 ^{ns}	2622.6 ^c	3309.0 ^{**}	1638.6 ^{bc}	1830.0 ^{**}	2723.0 ^{de}	3233.6 ^{***}	984.0 ^e	1479.0 ^{**}	100.3 ^b	-75.3 ^{ns}
Samnambyeo	72.30 ^c	73.25 ^{ns}	1993.0 ^a	3118.5 ^{***}	1164.6 ^a	1894.5 ^{**}	2056.6 ^a	3432.0 ^{***}	828.3 ^d	1224.0 [*]	63.6 ^b	313.5 ^{ns}
Dobongbyeo	82.52 ^d	82.18 ^{ns}	3146.0 ^d	3945.0 ^{**}	1833.0 ^d	2103.0 [*]	2540.0 ^c	3120.0 [*]	1313.0 ^f	1842.0 ^{**}	-606.0 ^a	-825.0 ^{**}

¹⁾ Storage months.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

*, **, *** significant at 5%, 1%, 0.1% level by T-test value.

(나) DSC 분석에 의한 전분입자의 호화특성 변화

7 품종 쌀 배유로부터 분리한 전분분획의 DSC thermogram의 저장에 따른 변화는 Table 4-41에 나타내었다. 호화온도에서 개시온도(T_o) 범위는 저장에 따라 $57.95^{\circ}\text{C} \sim 75.25^{\circ}\text{C}$ 에서 $58.2^{\circ}\text{C} \sim 75.28^{\circ}\text{C}$ 로, 호화피크(T_p) 온도는 $64.31^{\circ}\text{C} \sim 79.16^{\circ}\text{C}$ 에서 $65.05 \sim 79.81^{\circ}\text{C}$ 로 큰 변화를 보이지 않았으나 호화종결온도(T_c)는 식미가 우수한 삼광(74.76°C)과 고품(76.20°C)의 경우 저장에 따라 각각 79.92°C , 79.21°C 로 유의적인 증가를 나타내었다. 호화엔탈피 역시 저장에 따라 증가하는 경향 이었는데 특히, 식미치가 높은 삼광의 경우 2.63 J/g 에서 4.09 J/g 로 $p < 0.001$ 수준에서 유의적으로 증가하였다. 저장한 쌀의 배유 전분조직은 저장 중 결정의 결합강도가 증가된다. 취반 시 전분의 팽윤이 억제되고 밥의 텍스처에 영향을 주므로 모든 품종의 식미치가 감소한 것으로 보인다. 또한 저장 쌀의 세포벽은 가열에 의해 쉽게 파괴되지 못하고 가열에 대한 저항성이 크므로 호화에 필요한 에너지가 클 것으로 생각된다.

Table 4-41. Changes in DSC thermal properties of rice starch during storage

Variety	Storage months	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)			$\Delta H \text{ (Jg}^{-1}\text{)}$
		T_o	T_p	T_c	
Samgwangbyeo	0	58.86 ± 0.10^b	64.92 ± 0.15^c	74.76 ± 0.06^a	2.63 ± 0.18^a
	3	59.06 ± 0.18	65.49 ± 0.15	$79.92 \pm 0.09^{***}$	$4.09 \pm 0.15^{***}$
Gopumbyeo	0	58.40 ± 0.33^a	65.19 ± 0.10^d	76.20 ± 0.73^{bc}	3.19 ± 0.10^b
	3	58.65 ± 0.19	$65.77 \pm 0.15^*$	$79.21 \pm 0.66^{**}$	$3.67 \pm 0.16^*$
Chuchungbyeo	0	57.95 ± 0.19^a	64.31 ± 0.12^a	75.22 ± 0.08^{ab}	2.82 ± 0.24^a
	3	58.46 ± 0.36	$65.05 \pm 0.11^*$	75.39 ± 0.17	3.19 ± 0.08
Ilpumbyeo	0	58.15 ± 0.21^a	64.65 ± 0.09^b	76.66 ± 0.57^c	3.23 ± 0.07^b
	3	58.22 ± 0.23	$65.15 \pm 0.18^*$	76.67 ± 0.45	$3.48 \pm 0.06^*$
Palgongbyeo	0	59.92 ± 0.08^c	67.07 ± 0.12^e	78.67 ± 0.66^d	3.35 ± 0.25^b
	3	60.20 ± 0.12	$67.70 \pm 0.07^*$	80.96 ± 1.41	3.95 ± 0.29
Samnambyeo	0	60.04 ± 0.38^c	67.15 ± 0.06^e	78.32 ± 0.99^d	3.50 ± 0.21^b
	3	60.06 ± 0.05	67.57 ± 0.16	79.70 ± 1.12	3.55 ± 0.30
Dobongbyeo	0	75.25 ± 0.26^d	79.16 ± 0.16^f	90.06 ± 0.24^e	4.29 ± 0.14^c
	3	75.28 ± 0.32	$79.81 \pm 0.14^*$	90.08 ± 0.36	$4.85 \pm 0.13^*$

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

*, **, *** significant at 5%, 1%, 0.1% level by T-test value.

제5절 <제3협동과제> 벼 식미관여 유전자 분석을 위한 지도 작성 및 QTL 분석

1. 재료 및 방법

가. 분석재료

고양식미 벼품종으로 중만생종인 추청벼와 일품벼를 이용하였다. 추청벼는 1969년 일본에서 도입된 품종으로 Wakaba/Kinmaze 교잡으로부터 육성되었으며, 쌀외관이 깨끗하고 도정수율이 높으며, 식미가 양호하며 현재도 10만 ha 이상 재배되는 품종이다. 일품벼는 1990년 수원295호-sv3/Inabawase 교잡으로 육성되었으며, 밥맛이 매우 우수하고 수량성이 높은 품종이다. 고양식미 계통과 교잡된 수원365호는 식미가 다소 떨어지고 도열병에 저항성인 준조생 자포니카 계통이며, Moroberekan은 서부 아프리카 발벼로 도열병에 내구저항성인 열대 자포니카형 (javanica) 이다.

유전분석을 위해 육성된 재조합 계통 (recombinant inbred line)은 수원365호/추청벼와 일품벼/Moroberekan 두 조합으로부터 육성되었다. 2가지 재조합 계통의 육성 모식도는 그림 1과 같이 수원365호 x 추청벼 조합과 일품벼 x Moroberekan 조합의 F1 개체를 육성하여 F2 종자를 수확하고, 이후 F8 세대부터 SSD (Single seed descent) 법으로 세대를 진전하여 각각 190개 및 182개 재조합 계통을 선발하여 유전분석에 이용하였다.

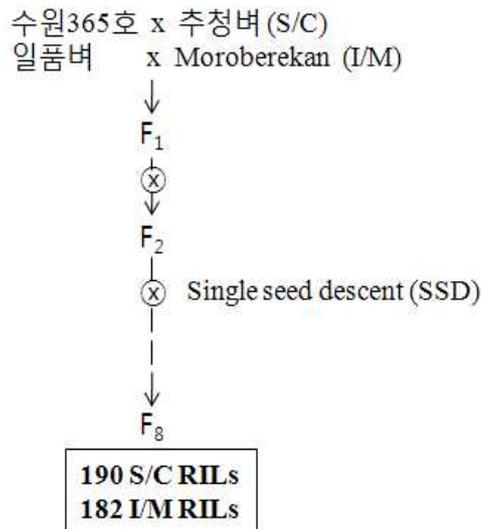


그림 1. 재조합 계통 집단 육성 모식도

나. 포장 재배

시험재료로 이용된 일품벼, 추청벼, 수원365호, Moroberekan 및 190계통 S/C RIL 집단 및 182계통 I/M RIL 집단은 국립식량과학원 시험포장(수원)에 농진청 표준재배법에 따라 재배하였다. 추청벼, 수원365호 및 190계통 S/C RIL 집단은 2006, 2007 및 2008년 보통기 보비재배한 시료를 분석에 이용하였으며, 일품벼, Moroberekan 및 182계통 I/M RIL 집단은 2007년 및

2008년 보통기 보비재배한 시료를 분석에 이용하였다.

농업형질 조사는 출수기, 간장, 수장, 주당수수, 수당립수, 등숙율, 친립중 및 수량 등을 조사하였다.

다. 식미관련 형질 분석

밥의 식미에 관련된 미질에 알카리붕괴도 (Alkali digestion value, ADV), 아밀로스함량 (amylose content, AC, %), 단백질함량 (protein content, PC, %) 등 전분의 이화학적 특성과 밥이 호화되는 과정의 윤기치 (Glossiness of cooked rice, GCR)는 Toyo mito-meter (모델: MA-90A, 90B)를 이용하여 분석하였다.

알카리붕괴도는 쌀을 1.4% KOH 용액에 담구어 30℃ 인큐베이터에 23시간 두었다가 쌀의 퍼짐정도를 1-7등급으로 결정하였다. 아밀로스함량은 Juliano (1971) 방법에 따라 Rapid Flow Autoanalyzer를 이용하여 starch-iodine blue color의 상대적 흡광도를 측정하여 결정하였다. 단백질함량은 Micro-Kjeldahl 법으로 FOSS:2300 Kjeltac Analyzer를 이용하여 측정하고 5.95값을 곱하여 질소함량을 결정하였다.

Toyo mito-meter기를 이용한 밥의 윤기 (GCR) 측정은 쌀 완전미 33g을 평량하여 캐스터에 넣고 10분간 끓는 물에서 호화시키고 3분간 실온에서 식힌 후 MA-90B에서 윤기치를 측정하였으며, 시험은 2반복 수행하였다.

패널에 의한 밥맛 평가는 국립식량과학원 답작과 품종개발연구팀에서 경험이 풍부한 연구원 5명으로 구성하여 식량원에서 개발된 컵밥 시스템으로 각 품종 또는 계통당 밥을 지어 체온과 비슷한 온도로 식힌 후에 시행하였다. 패널 평가는 밥 모양 및 윤기치(glossiness), 냄새 (scent), 맛(taste), 찰기(stickiness), 질감(hardness) 및 총평(overall evaluation) 등에 대해 시행하였고, 각 형질은 등급 -3~+3까지 7등급으로 하여 극히 나쁨에서 매우 좋음으로 평하였다.

라. DNA 추출 및 SSR 마커 분석

DNA 추출은 품종 또는 계통당 50-60개 종자를 파종하여 3주된 어린 잎을 채취하여 액체질소를 이용하여 곱게 마쇄한 다음에서 Causse et al. (1994)이 제시한 방법을 다소 변형하여 genomic DNA를 추출하였다. 유전자지도 작성은 SSR (simple sequence repeat) 마커를 이용하였으며, 이들 마커의 정보와 PCR 증폭과 증폭 DNA의 gel 전기영동은 Temnykh et al. (2000)와 McCouch et al. (2002)의 방법을 따랐다. DNA 증폭은 1) 5ng/ul 주형 DNA를 8ul, 10 x Buffer 2ul, 200uM dNTP 1.6ul, 4pMol forward 및 reverse primer 각각 0.4ul, 5U/ul Taq polymerase 0.1ul를 넣고 멸균수로 최종 부피 20ul로 하여 PCR하였다. PCR cycle은 1) 초기 DNA 변성은 95℃ 5분, 2) DNA 합성 cycle은 DNA 변성 94℃ 1분, primer annealing 55℃ 1분, DNA 증폭 72℃ 2분, 35 cycles을 수행하고 3) 최종 DNA 합성은 72℃10분간 수행하였다. 증폭된 DNA는 3 x formamide dye를 10ul 첨가고 95℃에서 5분 변성시키고 바로 얼음에서 냉각시켜 전기영동에 이용하였다.

전기영동은 4% acrylamide 변성 gel에 PCR 증폭 DNA 4ul를 loading하여 증폭된 DNA의 band 크기를 감안하여 40-80분간 running하였다. 전기영동 후 silver staining은 Panaud et al. (1996) 방법에 따라 수행하였다.

마. 유전자지도 작성 및 QTL 분석

유전자지도는 Mapmaker/exp ver3.0 program을 이용하여 연관군을 결정하였다 (Lander et al., 1987). 연관군은 마커들간 LOD 값 3.0 이상인 경우에 서로 연관된 것으로 결정하였으며, 마커간 거리는 Kosambi cM으로 표기하였다(Kosambi 1944). 마커들간 기본 정보는 Temnykh et al. (2000)와 Gramene Annotated Nipponbare Sequence map (2006, web site: <http://www.gramene.org>)을 이용하였고, 마커들이 RIL 집단에서 1 : 1 분리비 검정은 x2 검정법을 이용하였다.

바. 유전자지도 작성 및 QTL 분석

각 형질에 대한 QTL 분석은 QTL Cartographer 2.0 (Basten et al. 1997) 프로그램을 이용하여 simple interval mapping으로 수행하였고, 탐색된 candidate QTL의 정확성을 높이기 위하여 composite interval mapping (CIM)을 수행하였으며, CIM에 대한 유의 값은 각 형질당 1,000 치환율을 이용하여 결정하였다. 각 형질의 전체 표현형을 설명하는 phenotypic variance explained (PVE) 값은 RSq으로 표기하였다.

사. 유망계통 생산력 검정시험

본 시험에서 육성된 유망계통에 대한 농업형질 평가 및 수량성 검정 시험은 농촌진흥청 표준재배법에 따라 수행하였다. 재배법은 표 5-1과 같으며, 시비량은 보비재배 수준으로 하여 난괴법 2반복으로 재배하였다. 조사항목은 출수기, 간장, 수장, 수수, 천립중, 등숙율 등과 쌀수량 등을 조사하였다.

표 5-1. 생산력검정 시험 재배법 및 시비수준

파종기 (월.일)	이앙기 (월.일)	재식거리 (cm)	재식본수 (본/주)	시비량 (N-P ₂ O ₅ -K ₂ O, kg/10a)	반복수
4. 25	5. 28	30 x 15	3	9-4.5-5.7	난괴법 2

2. 결과 및 고찰

가. 자포니카 유전자지도 작성

(1) 자포니카 품종간 SSR 마커의 다형성

자포니카 벼의 유전자지도 작성을 위해 1,095 SSR 마커에 대해 수원365호와 추청벼간 다형성 검정을 실시한 결과, 320개 SSR 마커들이 다형성(29.2%)을 보였다(표 5-2). 유전자지도 작성

을 위해 수원365호 x 추청벼 조합의 F12 세대 재조합 집단에 대해 188개 SSR 마커가 genotyping되었다. 이들 마커 대부분은 모본과 부본에 대한 분리비가 1 : 1로 정상적인 분리를 하였고, 31개 마커(16.5%)는 특정 친의 allele type이 많은 편이된 분리비를 보였다. 편이된 분리를 보인 31개 마커들 중, 19개 마커(10.1%)는 수원365호 쪽으로, 12개 마커(6.4%)는 추청벼 쪽으로 편이된 분리를 하였다 (표 5-3). 편이된 분리를 하였던 마커 대부분은 1, 3, 4, 8, 및 9번 염색체상에서 3개 이상 서로 인접하여 위치하였고, 그 외 염색체상의 마커들은 여러 부위에 산재하여 있었다. 이 같이 분자마커들의 분리비 편이는 여러 연구자들에 의해 보고되었고(Causse et al. 1994, Xu et al. 1997, Matsushita et al. 2000), 유전적으로 근연인 japonica 벼들간 교잡에서 발생된 분리비 편이는 인디카와 자포니카간 원연교잡에서 발생비율보다 낮았다.

표 5-2. 자포니카벼 수원365호와 추청벼간 SSR 마커의 다형율

염색체	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	전체
검정 마커 수	169	137	114	101	92	97	84	82	46	43	65	65	1,095
다형성 마커수	36	40	23	36	18	26	38	2	16	20	23	19	320
다형율 (%)	21.3	29.2	20.2	35.6	19.6	26.8	45.2	30.5	34.8	46.5	35.4	29.2	29.2

표 5-3. 재조합 집단에서 분리비 SSR 마커 및 allele type

Chr.	Marker	X ²	Type	P-value	Chr.	Marker	X ²	Type	P-value
1	RM00580	7.85**	s ^{a)}	0.01~0.005	6	RM00190	6.22*	c	0.025~0.01
1	RM05914	6.97*	c	0.025~0.01	6	RM00587	6.57*	c	0.025~0.01
1	RM00486	29.76***	c	<0.005	8	RM07285	3.94*	c	0.05~0.025
1	RM05448	45.51***	c	<0.005	8	RM00342B	8.05**	c	0.01~0.005
1	RM01361	29.13***	c	<0.005	8	RM00342A	6.08*	c	0.025~0.01
3	RM03513	3.86*	s	0.05~0.025	8	RM00515	5.76*	c	0.025~0.01
3	RM02334	8.13**	s	0.01~0.005	9	RM00160	6.49*	s	0.025~0.01
3	RM02614	6.08*	s	0.025~0.01	9	OSR29	4.89*	s	0.05~0.025
4	RM03471	4.45*	c	0.025~0.01	9	OSR28	5.95*	s	0.05~0.025
4	RM03217	17.19***	s	<0.005	10	RM00216	4.22*	c	0.05~0.025
4	RM00255	18.23***	s	<0.005	11	RM00020B	4.07*	s	0.05~0.025
4	RM05709	17.75***	s	<0.005	11	RM05857	5.89*	s	0.025~0.01
4	RM00349	22.35***	s	<0.005	11	RM03428	6.89*	s	0.025~0.01
4	OSR15	18.36***	s	<0.005	11	RM00144	9.50**	s	0.01~0.005
4	RM00567	6.02*	s	0.05~0.025	12	RM00491	9.50**	s	0.01~0.005
4	RM08276	4.26*	s	0.05~0.025					

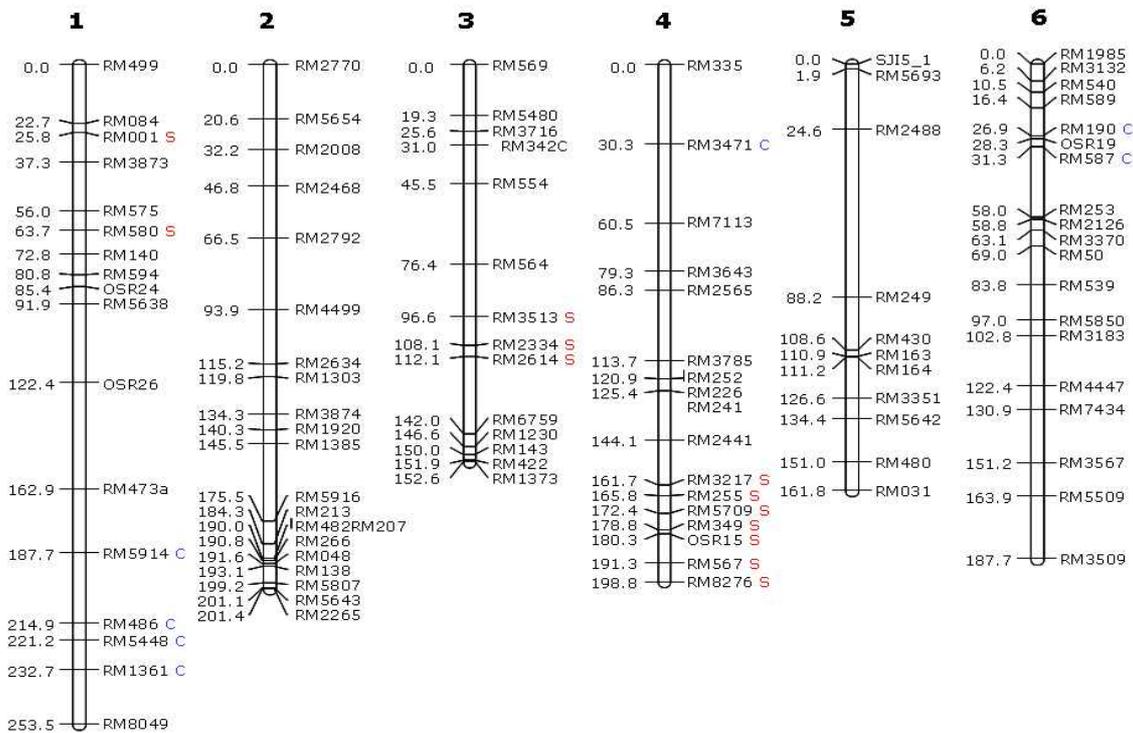
^{a)}s : 수원365호 allele type으로 편이, c : 추청벼 allele type으로 편이

*, **, *** : 5%, 1% and 0.1%에서 유의성

(2) 연관지도 작성

수원365호/추청벼 조합의 F12 재조합 집단에 대해 188개 SSR 마커를 분석하여 유전자 지도를 작성하였다. 모든 마커의 위치는 기 보고된 정보(Temnykh et al. 2000, McCouch et al. 2002, and Gramene Annotated Nipponbare Sequence map 2006)와 일치하였으며, 유전자 지도의 전체 크기는 1,902.2 cM이었고, 마커들간 평균 거리는 10.1 cM 이었다(그림 5-2, 표 5-4).

염색체 상의 4곳에서 큰 gap이 발생하였으며, 5번 염색체상의 RM2488와 RM249 마커 사이, 8번 염색체상의 RM515와 RM5717 마커 사이, 9번 염색체상의 RM219와 RM460 마커 사이, 12번 염색체상의 RM2972와 RM270 마커 사이에서 발생하였다. 이들은 Gramene Annotated Nipponbare Sequence map에서 물리적 크기는 각각 8.5, 7.6, 6.1 및 5.4 Mbp였고, 마커들간 거리는 각각 327, 230, 436, 및 245 kbp였다. 이들 gap의 다형율은 각각 3.8%, 0.0%, 0.0%, 및 4.5%였다(그림 5-3).



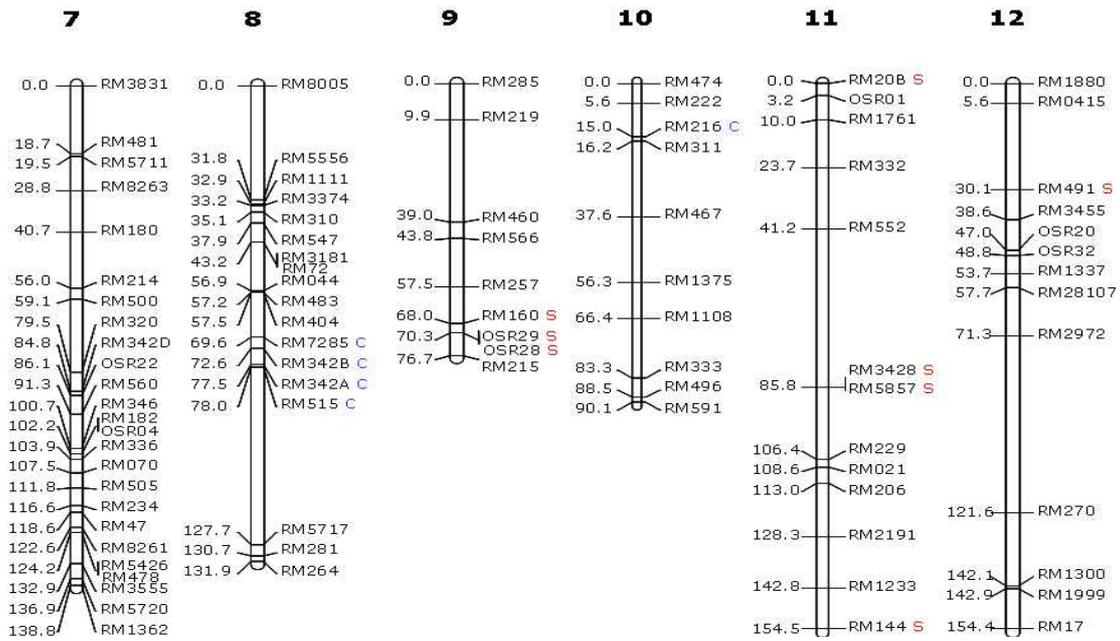
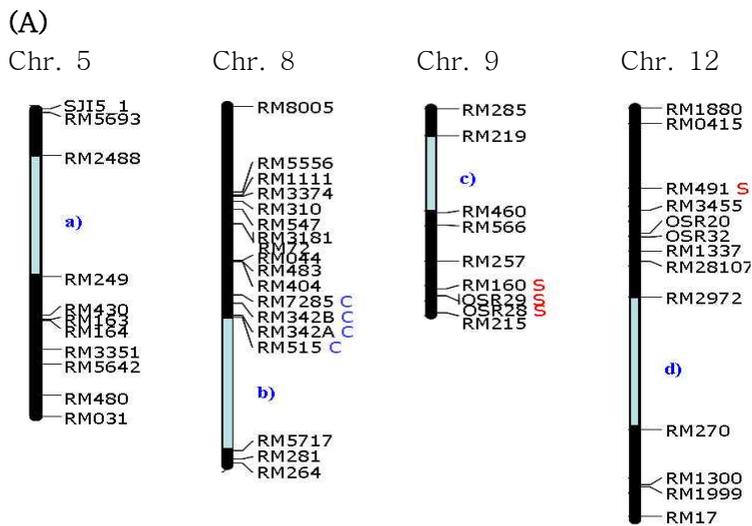


그림 5-2. 수원365호/추청벼 조합의 F₁₂ 재조합 집단에 이용한 유전자 지도
 * S : 수원365호 allele type으로 편이; C : 추청벼 allele type으로 편이

표 5-4. 유전자 지도의 염색체당 마커 수 및 크기 (cM)

구분	염색체												전체
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
마커 수	17	21	14	17	11	20	25	18	9	10	13	13	188
크기(cM)	253.5	201.4	152.6	198.8	161.8	187.7	138.8	131.9	76.7	90.1	154.5	154.4	1,902.2
마커간 평균 거리(cM)	14.9	9.6	10.9	11.7	14.7	9.4	5.6	7.3	8.5	9.0	11.9	11.9	10.1



(B)

구분	각 염색체의 gap			
	a)	b)	c)	d)
염색체 번호	5	8	9	12
지도상 위치(Mbp)	2.1-10.7	20.1-27.3	7.8-13.9	19.1-24.9
검정된 마커의 수	26	33	14	22
다형율(%)	3.8	0.0	0.0	4.5
Gap 길이(Mbp)	8.50	7.6	6.1	5.4
마커간 거리(kbp)	327	230	436	245

그림 5-3. 유전자 지도상의 monomorphic 부위(A)와 이들 지역의 물리적 거리(B)

본 연구에서 작성된 자포니카 유전자 지도는 크기가 1,902.2cM으로 벼 genome 전체에 마커들이 고루 분포하는 것으로 생각되며, 그 동안 자포니카 벼들간 교잡 집단을 이용하여 작성된 두개 유전자 지도의 크기 1,060cM(Wada et al. 2006) 및 891.1cM(Tabata et al. 2007)의 두 배에 달하였다. 이 유전자지도는 자포니카벼 유전 · 육종 연구를 위한 reference map으로 활용할 예정이다.

나. 수원365호/추청벼 조합을 이용한 식미관련 형질에 대한 QTL 분석

(1) 식미관련 형질의 분포 및 상관

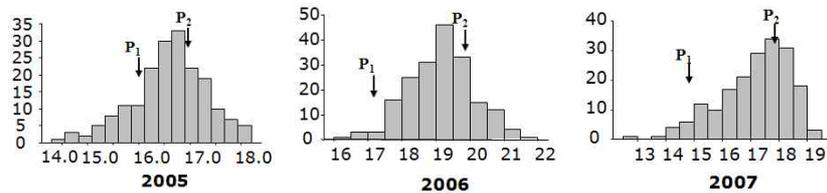
식미와 관련된 6개 형질, 알카리붕괴도, 아밀로스함량, 단백질함량, 윤기치, 밥맛 및 총평에 대해 양친과 재조합 계통에 대한 분석치는 표 5-4 및 그림 5-4와 같다. 알카리 붕괴도는 양친을 중심으로 대체로 bidominal 분포형을 보였고, 그 외 형질들은 양친을 중심으로 연속변이 분포를 하였고, 양친의 낮은 값 또는 높은 값을 초월하는 분리하는 경향이였다.

표 5-4. 양친과 재조합계통들의 쌀품질과 밥맛관련 형질

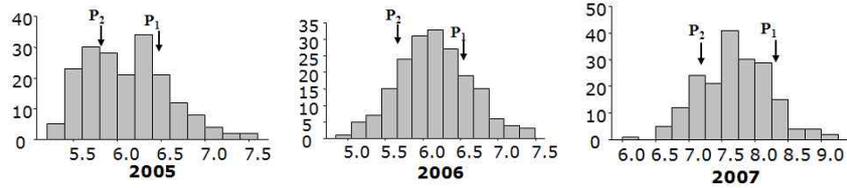
Traits	Years	Parents		RILs	
		Suweon365	Chucheong	Mean	Range
ADV	2005	6.0	6.4	6.3±0.13	5.7~6.6
	2006	6.1	6.7	6.5±0.19	4.1~6.9
	2007	5.6	6.8	6.7±0.64	5.9~6.9
AC	2005	16.2	18.8	18.5±0.82	16.1~20.5
	2006	17.2	19.7	19.1±1.0	16.2~21.7
	2007	15.7	19.2	18.9±0.9	16.4~20.9
PC	2005	6.50	5.80	6.1±0.46	5.3~7.5
	2006	6.50	5.90	6.2±0.5	4.8~7.5
	2007	8.74	6.96	7.4±0.6	5.9~9.3
GCR	2005	58.3	60.8	61.0±4.97	49.1~76.4
	2006	63.2	68.9	67.4±3.9	57.2~78.8
	2007	60.3	66.6	64.0±3.7	55.6~74.4
ST	2007	0.25	1.06	3.98±0.62	-0.67~2.67
OE	2007	0.00	1.09	1.02±0.71	-1.00~2.67

출수기와 식미관련 6가지 형질들간 상관관계를 분석한 결과는 표 5-5와 같다. 출수기와 식미 관련 형질들 중 단백질함량과는 부의 상관을 보였고, 알칼리붕괴도 등은 대부분 고도의 유의한 상관을 보여, 출수기가 조생인 경우보다 만생인 경우 알칼리붕괴도와 아밀로스함량이 높으며, 밥의 윤기치와 패널의 평가에 의한 밥맛 및 총평도 좋은 것으로 나타났다. 식미관련 6가지 형질들간 상관에서, 단백질함량은 다른 형질들과 부의 상관을 보였고, 그 외 형질들간은 고도의 유의한 상관을 보였다. 특히 밥의 윤기치와 밥맛 간에는 0.49**~0.51**의 고도로 유의한 상관값을 가졌고, 밥맛과 총평도간에는 0.90**의 가장 높은 상관 값을 나타내었다. 이들 형질들간 상관은 년차 간에 서로 유의한 차이를 보이는 경우가 많았으며, 이는 년차간 기후 차이에 의한 것으로 생각되며, 이 같은 결과는 Takeuchi et al. (2007)의 보고와 같은 경향이였다.

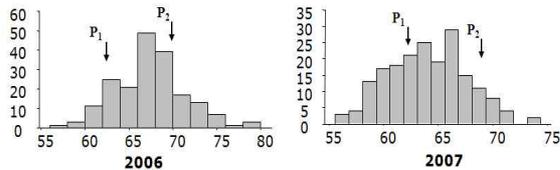
□ Amylose content



□ Protein content



□ Glossiness of cooked rice(GCR) by Toyo-taste meter



□ Sensory test by panelists

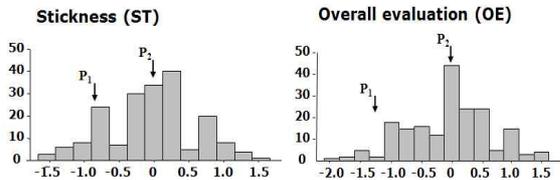


그림 5-4. 수원365호 및 추청벼와 재조합계통들의 쌀품질과 밥맛관련 형질 분포

표 5-5. 수원365호 및 추청벼와 재조합계통들의 밥맛 관련 형질들간 상관관계

Traits ^a	년도	출수기	ADV	AC	PC	GCR	TA
알카리붕괴도 (ADV)	1999	-0.05					
	2000	0.50**					
	2006	0.80**					
아밀로스함량 (AC)	1999	-0.14	0.12				
	2000	0.36**	0.28**				
	2006	0.43**	0.56**				
단백질함량 (PC)	1999	-0.31**	-0.06	-0.16**			
	2006	-0.18*	-0.23**	-0.43**			
윤기치 (GCR)	1999	0.32**	-0.10	0.07	-0.41**		
	2000	0.06	0.05	0.08			
	2006	0.57**	0.56**	0.52**	-0.40**		
밥맛(TA)	2006	0.38**	0.38**	0.353**	-0.30**	0.51**	
총평(PAL)	2006	0.40**	0.40**	0.35**	-0.26**	0.49**	0.90**

*, ** indicate significance at 0.05, 0.01 levels, respectively.

^a DTH: days to heading, ADV: Alkali digestion value, AC: amylose content, PC: protein content, GCR: glossiness of cooked rice.

(2) 식미관련 형질에 대한 QTL 탐색

쌀품질과 밥맛과 관련된 6가지 형질에 대한 20개 QTL이 탐색되었다 (표 5-6, 그림 5-5). 알카리붕괴도와 관련하여 4개 QTLs가 염색체 6, 7, 8 및 11번에서 탐색되었으며, qADV6와 qADV8는 2000년 및 2006년 시료 분석에서 탐색되었으며, qADV7와 qADV11 2006년 및 2007년 시료에서 탐색되었다. qADV6는 찰 유전자(wx) 좌위에 위치하였고, 2006년 표현형 변이 18.8%를 설명하였고, qADV8은 2006년 표현형 변이 30.8%를 설명하였다. 이들 QTLs qADV7, qADV8 및 qADV11는 추청벼 allele이 표현형 값을 증가시키고, qADV6는 수원365호 allele이 표현형 값을 증가시키는 QTL이었다.

단백질 함량과 관련된 4개 QTL은 염색체 1, 6, 7 및 8에서 탐색되었다. 1번 염색체 RM486-RM8049 좌위에서 위치하는 qPC1은 표현형 변이 9.0~20.7%를 설명하였고, qPC7와 qPC8은 각각 표현형 변이 7.7-8.5% 및 15.3-16.0%를 설명하였으며, 이들 QTLs는 수원365호 allele이 단백질 함량을 증가시키는 것으로 나타났다.

표 5-6. 수원365호/추청벼 재조합계통에서 탐색된 식미관련 형질들에 대한 QTLs

Trait	QTLs	Year	Chr.	Flanked marker	Composite Interval Mapping			Threshold*	Positive parent ^{a)}
					LOD	RSq	Add.		
Alkali digestible value (ADV)	<i>qADV6</i>	2000 2006	6	RM589-RM253	3.71 15.7	8.3 25.6	0.19 0.10	2.8 3.0	S
	<i>qADV7</i>	2006	7	RM3555-RM1362	3.22	8.0	0.07-	3.0	C
	<i>qADV8</i>	2000 2006	8	RM5556-RM547	3.77 14.26	11.2 31.4	0.22 0.11	2.8 3.0	C
	<i>qADV11</i>	2000	11	RM5857-RM229	3.62	10.4	0.07	2.8	C
Amylose content (AC)	<i>qAC6.1</i>	2005 2007	6	RM589-RM253	8.82 7.57	15.7 12.2	0.31 0.46	2.9 2.8	S
	<i>qAC6.2</i>	2006	6	RM50-RM539	3.35	6.3	0.19	2.9	C
	<i>qAC7</i>	2006 2007	7	RM3555-RM1362	2.07 -	3.3 -	0.18 -	2.9 2.8	C
	<i>qAC8</i>	2005 2006 2007	8	RM5556-RM547	8.04 10.61 14.56	21.3 27.5 34.0	0.35 0.51 0.74	2.9 2.9 2.8	C
	<i>qAC11</i>	2007	11	RM1761-RM552	3.87	8.4	0.37	2.8	C
Protein content (PC)	<i>qPC1</i>	1999 2005 2006 2007	1	RM486-RM8049	4.73 3.68 6.36 6.16	8.9 10.3 17.2 16.0	0.22 0.17 0.23 0.25	2.8 2.9 3.1 2.9	S
	<i>qPC6</i>	1999	6	RM587-RM253	3.47	8.7	0.19	2.8	C
	<i>qPC7</i>	2005 2007	7	RM8263-RM500	2.99 3.03	7.1 6.4	0.12 0.14	2.9 2.9	S
	<i>qPC8</i>	1999 2006	8	RM5556-RM547	4.64 4.90	14.2 13.8	0.24 0.18	2.8 3.1	S

* Significance at 0.05 level. ^{a)} S : Suwon365, C : Chucheong

표 5-6. 계속

Trait	QTLs	Year	Chr.	Flanked marker	Interval Mapping			Composite Interval Mapping			Threshold*	Positive parent ^{a)}
					LOD	RSq	Add.	LOD	RSq	Add.		
Glossiness of cooked rice	<i>qGCR4</i>	2007	4	RM2441-RM5709	1.83	5.8	0.89	5.13	10.6	1.22	3.0	S
	<i>qGCR6.1</i>	2006	6	RM589-RM253	3.79	9.8	1.25	7.9	17.6	1.68	3.1	S
	<i>qGCR6.2</i>	1999	6	RM3370-RM539	3.14	8.8	1.52	4.01	9.5	1.65	2.8	C
	<i>qGCR7</i>	2001 2006 2007	7	RM8261-RM3555	3.68 6.06 4.09	8.9 14.2 9.6	1.52 1.50 1.15	2.65 -	5.4 -	1.18 -	2.8 3.1 3.0	C
	<i>qGCR8</i>	2001 2006 2007	8	RM5556-RM547	3.1 11.45 9.85	8.6 26.1 22.4	1.46 2.02 1.74	6.08 14.46 10.90	13.2 32.9 19.4	2.46 2.28 1.68	2.8 3.1 3.1	C
Taste	<i>qTA8</i>	2006	8	RM5556-RM547	8.98	26.1	0.32	8.52	16.3	0.26	2.9	C
Palatability	<i>qPAL8</i>	2006	8	RM5556-RM547	8.39	18.4	0.31	8.13	15.8	0.29	3.0	C

* Significance at 0.05 level. ^{a)} S : Suwon365, C : Chucheong

밥의 윤기치와 관련된 5개 QTLs가 염색체 4, 6, 7 및 8에서 탐색되었고, 이들 중 3개 QTLs qGCR4, qGCR6.1 및 qGCR6.2는 단지 1개년에서만 탐색되었고, qGCR7 및 qGCR8는 3개년에 연속적으로 탐색되었다. 7번 염색체 RM8261-RM3555에 위치하는 qGCR7는 표현형 변이 8.8-14.2%를 설명하였고, 8번 염색체 RM5556-RM547에 위치하는 QTL qGCR8은 표현형 변이 8.6-26.1%를 설명하였으며, 추청벼 allele이 밥의 윤기치를 높이는 것으로 나타났다.

5명의 패널들이 밥맛을 평가하여 맛(taste)과 총평(palatability)에 대한 QTLs를 분석한 결과 8번 염색체 RM5556-RM547에 위치에서 qTA8과 qPAL8이 탐색되었고, 이들 QTLs 각각은 표현형 변이 16.3% 및 15.8%를 설명하였다 이 좌위에서는 알카리붕괴도, 아밀로스함량, 단백질 함량, 밥의 윤기치 관련 QTLs들도 함께 위치하였다.

염색체 6, 7 및 8번에서 탐색된 QTL 좌위는 여러 가지 형질들의 QTL들이 cluster되었으며, qGCR6.1은 출수기 qDTH6, 알카리붕괴도 qADV6 및 단백질 함량 qAC6.1들과 같은 위치였으며, qGCR7은 출수기 qDTH7, 알카리붕괴도 qADV7, 아밀로스함량 qAC7들과 cluster되었다. qGCR8 좌위는 qDTH8, qADV8, qAC8, qPC8, qTA8 및 qPAL8 QTL들과 함께 위치하였으며, 이는 Wada et al. (2004)에 의한 아밀로스함량, 윤기, 향기, 질감 및 밥맛과 관련된 QTL과 동일한 위치이다.

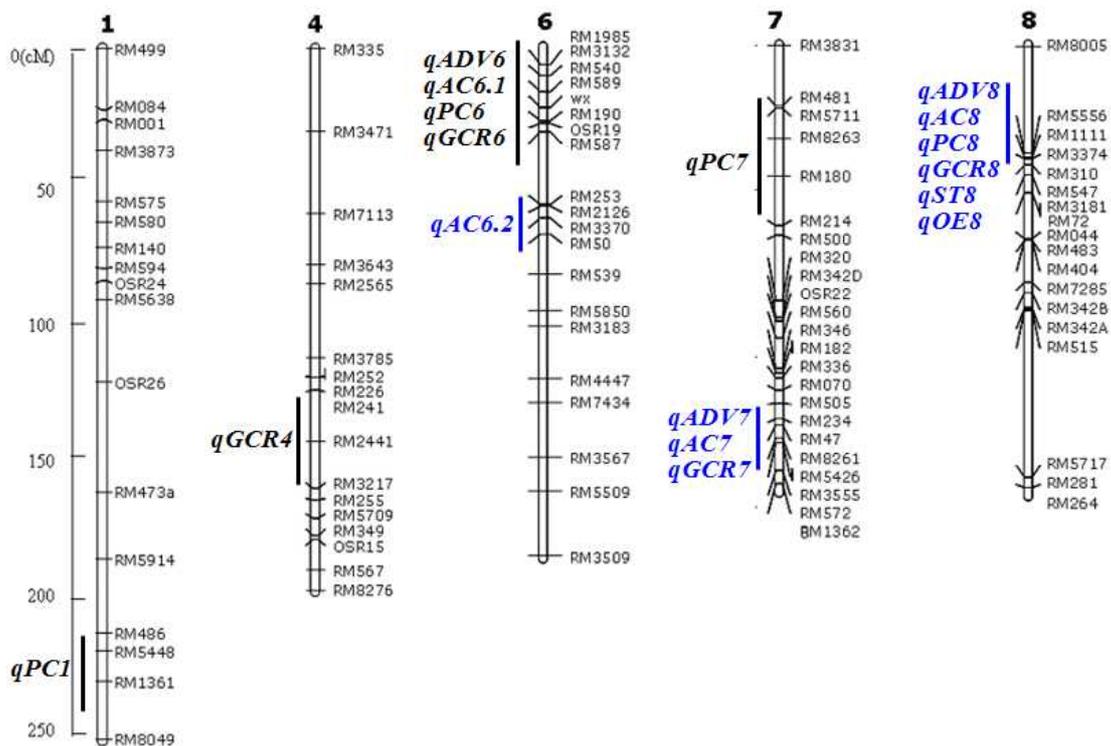


그림 5-5. 수원365호/추청벼 재조합계통에서 탐색된 식미관련 형질들에 대한 QTLs 좌위

(3) QTL-NIL을 이용하여 GCR 관련 QTL 효과 분석

GCR에 대한 QTL좌위를 보유하는 재조합계통에 대해 수원365호를 3회 여교잡하여 육성한 계통에 대한 QTL 효과를 검정하였다(표 5-6). BC3F2 집단에서 MAS로 qGCR7 및 qGCR8 좌위를 검정하여 추청벼 allele에 대해 homozygous, heterozygous 및 non allele 개체를 선발하여 밥의 윤기치를 검정한 결과, 추청벼 homozygous allele은 qGCR7과 qGCR8에서 각각 2.35 및 2.25의 GCR 값을 증가시켰다.

표 5-6. BC3F1 및 BC3F2 집단에서 GCR QTL의 효과 분석

QTLs	Chr no.	Flanking marker	BC ₃ F ₁ (2004)			BC ₃ F ₂ (2005)		
			C/S	S/S	C/C	C/S	S/S	Allelic effect
<i>qGCR-7</i>	7	RM47-RM473a	69.9	66.3	70.8	68.5	66.1	2.35
<i>qGCR-8</i>	8	RM72-RM547	69.6	66.8	69.7	68.1	65.2	2.25
Suwon365 (Recurrent)			66.2			65.5		
Chucheong (Donor)			72.8			73.1		

육성된 BC3F3 3계통 SCQ04, SCQ07, SCQ14들은 QTL qGCR6.1의 RM589-RM587 좌위, qGCR7의 RM8261-RM3555 좌위 및 qGCR8의 RM5556-RM547 좌위를 각각 보유하는 계통들로 이들에 대한 GCR 평가 결과는 표 5-7 및 그림 5-6과 같다. QTL qGCR8을 보유하는 근동질 계통 SCQ04는 2005년과 2006년 각각 GCR 77 및 80으로 추청벼와 같은 수준의 밥의 윤기치를 가졌으며, qGCR7을 보유하는 SCQ07 계통도 추청벼와 비슷한 수준의 GCR 값을 가졌다. SCQ14는 3개 QTL 좌위에서 모두 GCR 값을 낮추는 쪽의 allele을 보유한 계통으로 2개년 모두 GCR 값이 수원365호와 비슷하거나 낮은 값을 가졌다. 이 결과는 qGCR6.1에서 추청벼 allele이 GCR 값을 낮추고, qGCR7과 qGCR8에서 추청벼 allele이 GCR 값을 증가시키는 결과를 입증하였다. 6번 염색체 RM589-RM587 염색체상의 QTL qGCR6.1은 쌀 품질과 관련된 많은 QTL들이 위치하는 것으로 보고되었다 (Li et al. 2003, Takeuchi et al. 2007).

표 5-7. QTL-NIL 계통들의 밥의 윤기치

Line No.	Genotype on QTLs			Mean value of GCR	
	<i>qGCR6-1</i>	<i>qGCR7</i>	<i>qGCR8</i>	2005	2006
SCQ04	CC	SS	CC	77	80
SCQ07	SS	CC	SS	73	82
SCQ14	CC	SS	SS	66	64
Suwon365				67	73
Chucheong				80	78

* CC : Chucheong homozygous; SS : Suwon365 homozygous

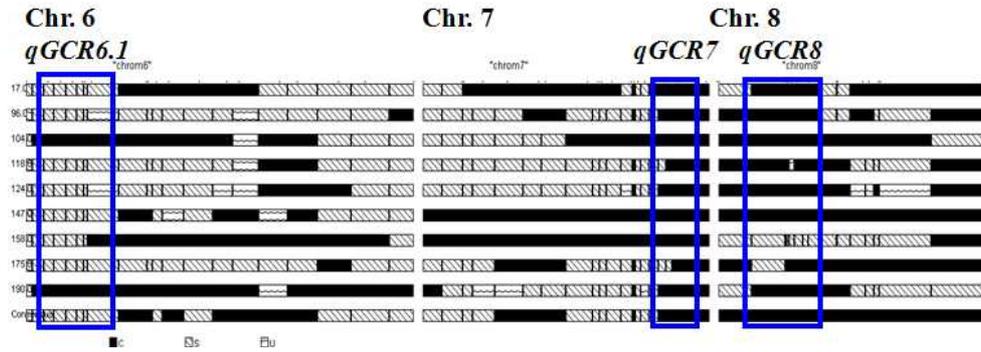


그림 5-6. QTL-NIL 3계통의 QTL좌위에 대한 염색체 치환

다. 일품벼/Moroberekan 조합에서 식미관련 형질에 대한 QTL 분석

(1) 식미관련 형질의 분포 및 상관

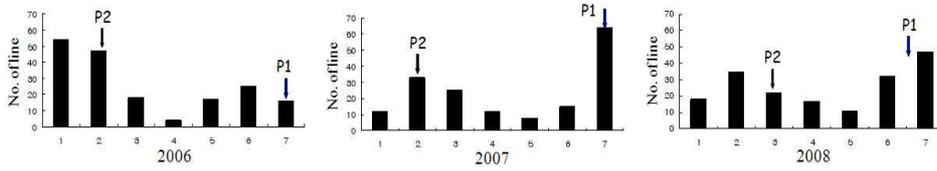
식미와 관련된 알카리붕괴도, 아밀로스함량, 밥의 윤기치(Toyo 미터)와 패널 식미평가에 의한 윤기, 맛, 질감 및 총평에 대한 분포는 그림 5-7과 같다. 알카리붕괴도와 아밀로스함량은 2006~2008년 모두 양친을 중심으로 binomial 분포를 하는 경향이었고, Toyo-taste meter를 이용한 밥의 윤기치 분석 결과는 정규분포를 하였다. 패널 식미평가 결과에서 윤기, 맛, 질감 및 총평 모두 양친을 중심으로 binomial 분포의 경향을 보였다. 이 같은 경향은 수원365호/추청벼 조합 재조합집단의 평가와 다소 다른 경향을 보였는데, 이는 일품벼와 Moroberekan의 식미치가 매우 큰 차이를 보이기 때문인 것으로 생각된다. Moroberekan은 서부 아프리카 발벼로 밥은 찰기가 매우 부족하고, 식으면 딱딱하게 굳는 경향을 보였다.

식미관련 형질들 중 알카리붕괴도와 아밀로스함량간 상관은 본시험에서 유의한 경향은 없어, 수원365호/추청벼 재조합집단간 분석 결과 (표 5-5)와는 다소 차이가 있었다 (표 5-8). 알카리붕괴도와 밥의 윤기치 간에는 고도의 유의한 상관을 보였고, 아밀로스함량은 밥의 윤기치 및 패널 식미평가에 의한 요소들 간에 부의 유의한 상관을 보였다. 밥의 윤기치(GCR)와 패널 식미평가에 의한 윤기(GL), 맛(ST), 질감(HA) 및 총평(OE)들 간에는 서로 고도의 유의한 정의 상관을 보였다. 이들 결과에서 알카리붕괴도는 높고, 아밀로스함량은 낮으며, 윤기, 맛, 질감 및 총평은 높을 수록 밥맛이 좋은 것으로 생각된다.

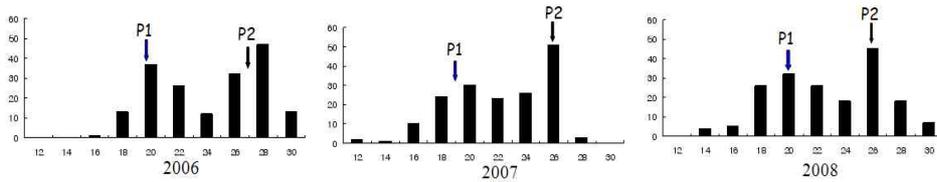
표 5-8. 일품벼/Moroberekan 재조합집단 계통들의 밥맛 관련 형질들간 상관관계

구분	07ADV	08ADV	06AC	07AC	06GCR	07GCR	08GCR	GL	ST	HA
08ADV	0.752**									
06AC	-0.023 ^{ns}	0.094 ^{ns}								
07AC	-0.010 ^{ns}	0.172*	0.836**							
06GCR	0.454**	0.357**	-0.194**	-0.157*						
07GCR	0.536**	0.626**	-0.128 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.608**					
08GCR	0.314**	0.308**	-0.315**	-0.202**	0.495**	0.554**				
GL	-	0.438**	-0.273**	-0.129 ^{ns}	0.266**	0.330**	0.469**			
ST	-	0.501**	-0.666**	-0.543**	0.262**	0.285**	0.497*	0.752**		
HA	-	0.663**	-0.662**	-0.534**	0.287**	0.289**	0.494**	0.746**	0.967**	
OE	-	0.538**	-0.637**	-0.501**	0.277**	0.303**	0.506**	0.786**	0.978**	0.972**

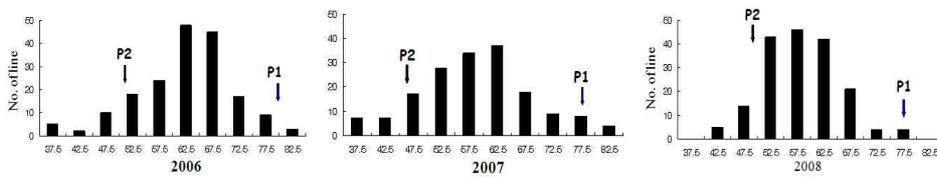
□ Alkali digestive value (ADV)



□ Amylose content (AC)



□ Glossiness of cooked rice (GCR)



□ Glossiness (GL), stickiness (ST), hardness (HA), and overall evaluation (OE) of sensory test

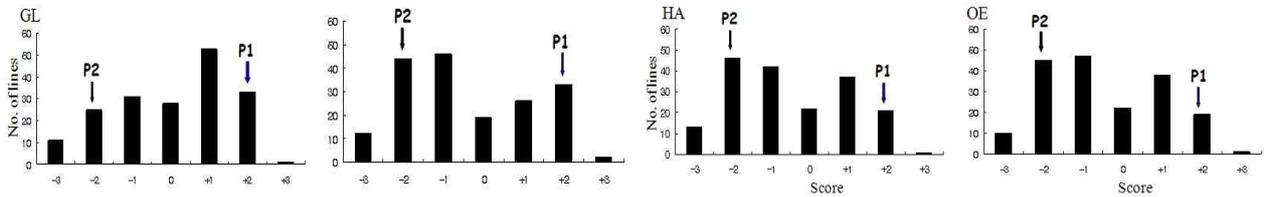


그림 5-7. 수원365호 및 추청벼와 재조합계통들의 쌀품질과 밥맛관련 형질 분포

P1 : 일품벼; P2 : Moroberekan

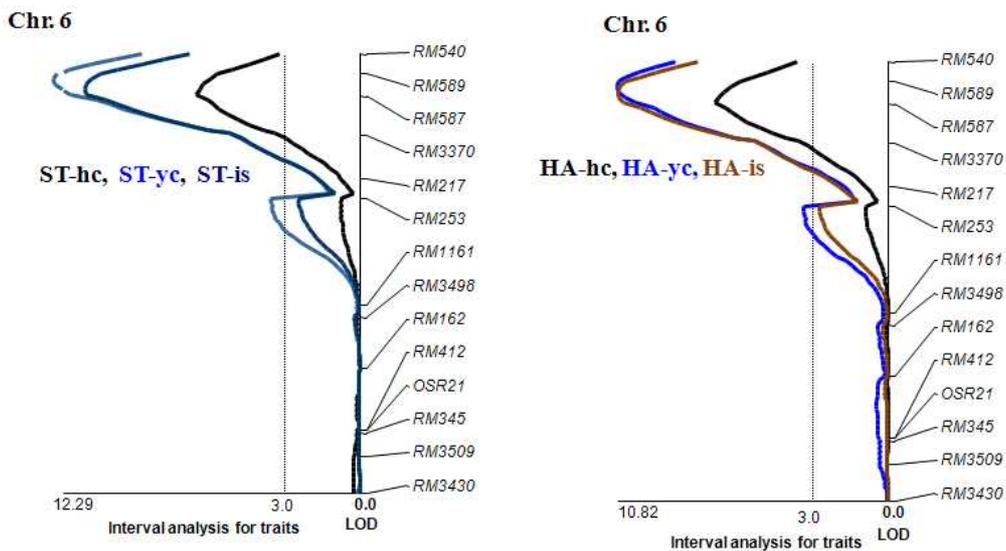


그림 5-8. 일품벼/Moroberekan RIL 집단에서 밥맛과 질감에 대한 QTLs.

*3명의 패널에 의해 평가된 값에 대한 QTL 좌위

(2) 식미관련형질들에 대한 QTL 분석

일품벼/Moroberekan 재조합 집단에 대한 QTL 분석 결과, 알카리붕괴도(ADV)에 대해 염색체 1번, 6번, 10번 및 12번에서 5개 QTLs가 탐색되었고, 아밀로스함량(AC)에 대한 QTL은 3, 6, 10, 및 11번 염색체에서 4개가 탐색되었고(표 5-9), 밥의 윤기치(GCR)에 대한 QTL은 염색체 3, 6, 9번, 10번, 12번에서 7개 탐색되었으며 (표 5-10), 패넬의 식미평가에 의한 윤기(GL), 맛(ST), 질감(HA) 및 총평(OE)들에 대한 QTL은 염색체 1번, 3번, 5번, 6번 및 10번에서 17개 QTLs가 탐색되었다(표 5-11). 특히 식미 관련 형질 중 맛과 질감에 대해 3명의 패넬이 평가한 값에 대한 QTL은 그림 5-8과 같이 같은 좌위에서 탐색되었고, 각각의 peak 값만 다소 차이가 있었다. 본 시험에서 탐색된 QTL의 염색체상 위치는 그림 5-9와 같다.

알카리붕괴도(ADV)에 대한 qADV6.1은 표현형 변이 32.1~40.6%를 설명하는 QTL로 RM587-RM3370 부위는 wx 유전자가 위치하고 RM3370 부근에는 alk 유전자가 위치하였고, qADV6.2 좌위는 alk 유전자 위치와 다소 long arm 쪽에 위치하며, 표현형 변이를 11.7~18%를 설명하였으며, 이들은 일품벼 allele이 ADV 값을 높이는 것으로 나타났다. qADV10과 qADV11은 각각 표현형 변이 8.8~10.6%와 6.1~6.4%를 설명하였고, Moroberekan allele이 ADV 값을 증가시켰다.

아밀로스함량(AC)에 대한 qAC3과 qAC6은 일품벼 allele이 AC 값을 낮추는 QTLs로 년차간 변이 없이 항상 같은 위치에서 탐색되었고, 각각 표현형 변이 5.8~11.8% 및 47.3~56.9%를 설명하여 특히 wx 좌위의 qAC6은 major QTL인 것으로 나타났다. qAC10과 qAC11은 Moroberekan allele이 AC 값을 낮추는 쪽으로 작용하는 QTLs로 표현형 변이를 각각 8.7~9.9% 및 8.2%를 설명하였다.

표 5-9. 일품벼/Moroberekan RIL 집단에서 알카리붕괴도와 아밀로스함량 관련 QTLs

Trait	QTL	Year	Chr.	Linked markers	LOD	R2(%)	Allele effect
ADV (Alkali digestive value)	<i>qADV1</i>	2006	1	RM3602-RM529	2.89	8.3	1.35
		2007		TM3602-RM529	-3.69	-9.9	-1.38
	<i>qADV6.1</i>	2006	6	RM587-RM3370	15.15	40.6	2.85
		2007		RM3370-RM217	12.37	36.6	2.67
		2008		RM587-RM3370	10.77	32.1	2.43
	<i>qADV6.2</i>	2006	6	RM1161-RM3498	7.55	18.0	2.05
		2007		RM1161-RM3498	5.15	13.6	1.80
		2008		RM1161-RM3498	4.12	11.7	1.59
	<i>qADV10</i>	2007	10	RM467-RM1375	-3.24	-8.8	-1.30
		2008		RM467-RM1375	-4.08	-10.6	-1.55
	<i>qADV12</i>	2006	12	RM1300	-2.38	-6.1	-1.05
		2007		RM1300	-2.33	-6.4	-1.10
AC Amylose content, %)	<i>qAC3</i>	2006	3	RM6349-RM523	-2.28	-5.8	-1.7
		2007		RM6349-RM523	-3.23	-8.5	-2.1
		2008		RM6349-RM523	-5.02	-11.8	-2.8
	<i>qAC6</i>	2006	6	RM589-RM3370	-31.49	-56.9	-5.7
		2007		RM589-RM3370	-19.95	-44.8	-4.9
		2008		RM589-RM3370	-22.47	-47.3	-5.1
	<i>qAC10</i>	2006	10	RM333	3.00	8.7	2.1
		2008		RM-484-RM333	3.76	9.9	2.6
	<i>qAC11</i>	2006	11	RM1761	2.85	8.2	2.2

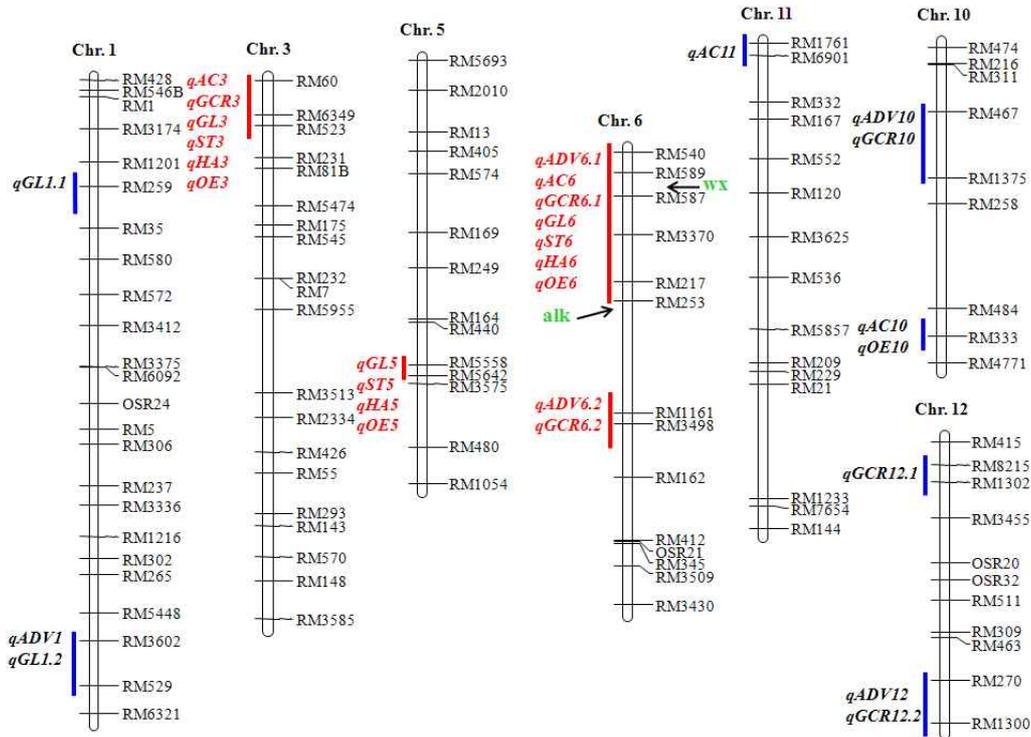


그림 5-9. 일품벼/Moroberekan RIL 집단에서 식미관련 형질에 대해 탐색된 QTLs 위치

표 5-10. 일품벼/Moroberekan RIL 집단에서 밥의 윤기치(GCR) 관련 QTLs

Trait	QTL	Year	Chr.	Linked markers	LOD	R2(%)	Allele effect
GCR (Glossiness of cooked rice)	<i>qGCR3</i>	2006		RM60-RM523	3.81	9.6	5.5
		2007		RM60-RM523	2.04	5.5	4.7
		2008		RM60-RM523	2.77	7.5	3.9
	<i>qGCR6.1</i>	2006		RM589-RM217	6.81	20.9	8.8
		2007	6	RM589-RM217	9.11	28.3	10.3
		2008		RM589-RM217	7.55	18.0	5.9
	<i>qGCR6.2</i>	2006		RM1161-RM3098	3.98	9.9	6.5
		2007	6	RM1161-RM3098	6.24	16.2	9.3
		2008		RM1161-RM3098	2.27	5.9	3.4
	<i>qGCR9</i>	2006		RM1553	2.30	5.8	4.4
		2007	9	RM1553	2.95	7.9	5.6
	<i>qGCR10</i>	2006		RM467	-2.13	-5.4	-4.3
		2007	10	RM1375	-2.53	-6.9	-5.3
	<i>qGCR12.1</i>	2006		RM8215-RM1302	-2.91	-7.8	-5.1
2007		12	RM1302	-2.02	-5.9	-4.7	
<i>qGCR12.2</i>	2006		RM270	-2.36	-6.1	-4.6	
	2007	12	RM270	-3.58	-9.8	-6.4	

밥의 윤기치(GCR) 관련 QTLs 중 *qGCR3*, *qGCR6.1*, *qGCR6.2* 및 *qGCR9*는 일품벼 allele이 GCR을 증가시키며, 각각 표현형 변이를 5.5~9.6%, 18~28.3%, 5.9~16.2%, 5.8~7.9% 설명하였고, 3개 QTLs *qGCR3*, *qGCR6.1* 및 *qGCR6.2*는 3개년 모두, *qGCR9*는 2006년과 2007년에 탐색되었다 (표 5-10). *qGCR10*, *qGCR12.1* 및 *qGCR12.2*는 모두 2006년과 2007년에 탐색되었고, 표현형 변이 5.4~6.9%, 5.9~7.8% 및 6.1~9.8%를 설명하였고, 이들은 Moroberekan allele이 표현형 값을 증가시키는 것으로 나타났다. 이 상의 결과에서 *qGCR6.1*은 3개년 모두 같은 좌위에서

표현형 변이를 18.0~28.3%를 설명하는 major QTL로 탐색되었다. Toyo-taste meter로 측정된 밥의 윤기치(GCR)는 패넬의 식미치와 상관이 0.81~0.89로 매우 높다고 보고하였으며 (Lee et al. 2004), 이 같은 결과들은 Toyo-taste meter의 GCR이 밥의 식미치를 간접적으로 평가할 수 있는 형질로 생각된다.

패넬의 식미평가로 얻은 윤기(GL), 맛(ST), 질감(HA) 및 총평(OE)에 대한 QTLs는 염색체 1번, 3번, 5번, 6번 및 10번에서 탐색되었으며, 염색체 3번, 5번 및 6번상의 QTLs는 일품벼 allele이 값을 증가시켰고, 1번 및 10번 염색체상의 QTLs는 Moroberekan allele이 값을 증가시켰다 (표 5-11). 4가지 형질에 대한 QTLs 들중 3번 염색체상의 QTL은 모두 표현형 변이 10.9~15.7%를 설명하였고, 5번 염색체상의 QTL은 7.3~9.0%의 표현형을 설명하였다. 6번 염색체상의 QTL 중 qGL6는 표현형 변이 8.4%를 설명하였고, qST6, qHA6 및 qOE6는 각각 표현형 변이 38.5%, 37.4% 및 34.3%를 설명하는 major QTL이었다. Moroberekan allele에 의한 10번 염색체상의 QTL qST10, qHA10 및 qOE10은 각각 표현형 변이 9.4%, 6.9% 및 7.9%를 설명하였다.

표 5-11. 일품벼/Moroberekan RIL 집단에 대해 패넬의 식미관련 형질 평가에 대한 QTLs

Trait	QTL	Chr.	Linked markers	LOD	R2(%)	Allele effect
GL (Glossiness)	<i>qGL1.1</i>	1	RM259	-2.59	-7.2	-0.71
	<i>qGL1.2</i>	1	RM529	-2.17	-6.1	-0.66
	<i>qGL3</i>	3	RM60-RM523	5.58	15.7	1.06
	<i>qGL5</i>	5	RM5693	2.99	9.0	0.78
	<i>qGL6</i>	6	RM587	3.08	8.4	0.76
ST (Stickness)	<i>qST3</i>	3	RM60-RM523	4.21	12.1	1.04
	<i>qST5</i>	5	RM5642	2.59	7.6	0.82
	<i>qST6</i>	6	RM540-RM3370	15.94	38.5	1.84
	<i>qST10</i>	10	RM333	-2.89	-9.4	-0.92
HA (Hardness)	<i>qHA3</i>	3	RM60-RM523	3.64	10.9	0.92
	<i>qHA5</i>	5	RM5558-RM5642	2.87	8.2	0.80
	<i>qHA6</i>	6	RM540-RM217	14.64	37.4	1.74
	<i>qHA10</i>	10	RM333	-2.10	-6.9	-0.73
OE (Overall evaluation)	<i>qOE3</i>	3	RM60-RM523	4.19	12.7	0.97
	<i>qOE5</i>	5	RM5558-RM5642	2.50	7.3	0.73
	<i>qOE6</i>	6	RM540-RM217	12.96	34.3	1.64
	<i>qOE10</i>	10	RM333	-2.38	-7.9	-0.77

일품벼/Moroberekan RIL 집단에서 탐색된 식미관련 QTL들 중 3번, 5번 및 6번 염색체 상의 QTLs가 자포니카 식미에 큰 영향을 미치는 major QTLs로 추정되며, 이들을 qEQ3, qEQ5 및 qEQ6.1로 표기하고자 한다. 3번 염색체 RM60~RM523 좌위의 qEQ3은 AC, GCR, GL, ST, HA 및 OE 관련 QTLs 함께 위치하였으며, 추청벼의 식미관련 QTL은 탐색되지 않았고, Koshihikari의 식미관련 QTL가 탐색된 좌위이다 (Takeuchi et al. 2007). 5번 염색체상의 RM5558~RM5642 좌위의 qEQ5는 패넬의 식미평가에 의한 GL, ST, HA 및 OE 관련 QTLs가 탐색되었으며, 이 좌위는 추청벼, Koshihikari에서는 탐색되지 않은 일품벼 고유 allele에 의한

것으로 생각된다. 6번 염색체상의 RM540~RM253 QTL 좌위의 qEQ6.1은 ADV, AC, GCR, GL, ST, HA 및 OE 관련 QTLs 함께 위치하였으며, 이 좌위는 자포니카의 밥맛에 매우 중요한 영향을 미치는 Waxy 유전자와 alk 유전자가 위치하는 곳이며, 수원365호/추청벼 RIL 집단 분석에서 qEQ6.1 좌위는 수원365호 allele이 GCR을 증가시키고, Koshihikari allele도 이 좌위에서 식미치와 관련된 QTL을 보유하는 것으로 나타났다 (Lanceras et al. 2000, Li et al. 2003, Aluko et al. 2004, Takeuchi et al. 2007). 그 외 QTLs들은 Moroberekan allele들이 식미관련 QTLs에 영향하는 것으로 나타나, 금후 이들 QTL 좌위를 도입한 QTL-NIL 계통을 육성하여 allele effect를 분석하여 유효한 QTL을 자포니카 식미치 개선을 위한 새로운 allele로 활용하는 것이 필요하다.

(3) 식미관련 QTL 효과 분석

수원365호/추청벼 및 일품벼/Moroberekan 재조합 집단에서 추청벼 및 일품벼 allele에 의한 식미관련 QTLs를 식미치가 낮은 팔공벼에 도입하여 그 효과를 분석한 결과는 표 5-12 및 표 5-13과 같다. 추청벼의 GCR 관련 QTLs qGCR7 및 qGCR8을 보유한 RIL 계통을 팔공벼와 교잡하여 육성한 BC1F3 계통에 대한 GCR 검정에서 모든 계통은 팔공벼의 GCR 64.5보다 높은 값을 가져, 식미치가 개선되는 효과를 가지는 것으로 나타났다 (표 5-12). 계통에 따라 추청벼보다 밥의 윤기치가 개선된 계통을 선발할 수 있어 이들 계통을 고양식미 자포니카 품종육성을 위한 중간모본으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 호평벼에 이들 QTL 좌위를 도입한 경우도 GCR 값을 증진시키는 것으로 나타났다. 일품벼의 식미관련 QTL을 팔공벼에 도입한 경우, 팔공벼의 GCR 값 보다 높았으며, 식미평가 총평 값도 증진되는 것으로 나타났다 (표 5-13). 이 같은 결과로 볼 때 고양식미 자포니카 벼품종육성에 식미관련 형질의 QTL을 MAS로 도입하여 육종효율을 증진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

표 5-12. 추청벼 allele에 의한 식미관련 QTL 좌위의 효과 분석

Cross combination	QTLs	Gen.	No. of line	GCR	
				Mean	Range
Palgong*2/SR25577-F ₁₄ -17	<i>qGCR6.1, qGCR7, qGCR8</i>	BC ₁ F ₃	4	72.6	67.6-74.8
Palgong*2/SR25577-F ₁₄ -100	<i>qGCR6.1, qGCR7, qGCR8</i>	"	12	71.8	63.7-76.5
Palgong*2/SR25577-F ₁₄ -108	<i>qGCR6.1, qGCR7</i>	"	10	73.9	65-78.2
Palgong*2/SR25577-F ₁₄ -118	<i>qGCR7, qGCR8</i>	"	17	70.9	64.1- 75.4
Palgong*2/SR25577-F ₁₄ -147	<i>qGCR6.1, qGCR7, qGCR8</i>	"	8	68.4	62.9-72.6
Palgong*2/SR25577-F ₁₄ -154	<i>qGCR6.1, qGCR7, qGCR8</i>	"	5	73.2	68.2-76.8
Palgong*2/SR25577-F ₁₄ -196	<i>qGCR7, qGCR8</i>	"	18	72.7	65.8-81.2
Hopyeong*2/SR25577-F ₁₄ -17	<i>qGCR6.1, qGCR7, qGCR8</i>	"	16	77.8	69.7-83.7
Chucheong	-			72.4	
Palgong*	-			64.5	
Hopyeong	-			73.6	

표 5-13. 추청벼 allele에 의한 식미관련 QTL 좌위의 효과 분석

Cross combination	QTLs from Ilpum			Gen.	GCR	OE
	Chr.3	Chr. 5	Chr. 6			
Palgong//Ilpum/Palgong-4	H	H	II	BC ₁ F ₃	72.2	+1
Palgong//Ilpum/Palgong-25	II	II	II	"	73.9	+1
Palgong//Ilpum/Palgong-30	H	II	II	"	68.1	0
Palgong//Ilpum/Palgong-46	H	II	H	"	79.6	0
Palgong//Ilpum/Palgong-79	II	II	II	"	80.2	+2
Palgong//Ilpum/Palgong-142	II	II	H	"	74.7	0
Ilpum*2/Palgong-13	II	II	II	"	75.7	+1
Ilpum*2/Palgong-17	II	PP	PP	"	78.9	+1
Ilpum*2/Palgong-24	H	H	II	"	76.4	+1
Ilpum*2/Palgong-26	H	II	II	"	77.4	0
Ilpum					76.4	+2
Palgong					66.9	-1

* II : Ilpum homo; PP : Palgong homo; H : Heterozygous



라. 고양식미 계통 '수원536호' 육성

수원365호/추청벼 조합 RIL 계통들 중에 농업형질과 식미치 등이 양호한 계통 SR23577 F14-31-1-B를 선발하여 '수원536호'로 명명하였다. '수원536호'는 출수기가 8월19일인 중만생종이며, 간장은 86cm로 화성벼보다는 5cm 크고, 추청벼 보다는 다소 작다. 수수는 15개이며, 수당립수는 104개로 다소 많은 편이고, 현미천립중은 22.4g인 중립종이고 심복백이 없이 쌀알은 매우 깨끗한 편이다. '수원536호'는 도열병과 줄무늬잎마름병에는 저항성이며, 흰잎마름병에는 이병성이고, 벼멸구류에 대해서도 저항성이 없으며, 쌀수량은 584kg/10a로 화성벼 대비 98%이다. '수원536호'는 2010년부터 지역적응시험에 공시할 예정이다.

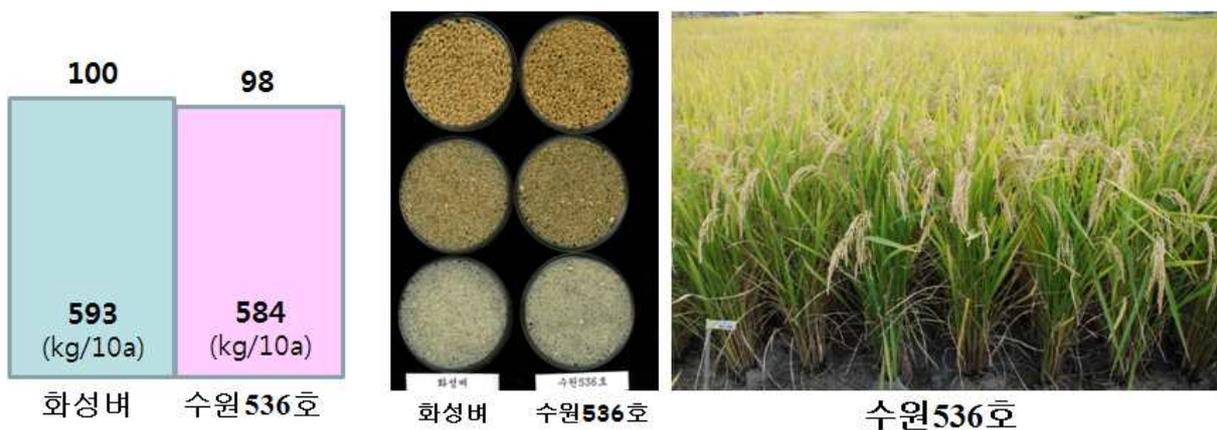


그림 5-10. '수원536호'의 수량성, 쌀외관 및 포장 초형

표 5-14. '수원536호'의 농업형질 및 수량성

계통명	출수기 (월.일)	간장 (cm)	수수 (개)	립수 (개)	현미천 립중(g)	심/복백	병해저항성			쌀수량 (kg/10a)
							도열병	흰잎마 름병	줄무늬 마름병	
수원536호	8.19	86	15	104	22.4 g	0/0	R	S	R	584
화성벼	8.14	81	15	90	23.2 g	1/1	S	M	R	593

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전의 기여도 등을 기술

<제1세부과제> 식미 선발표지 개발과 식미증진 벼 계통 육성

구분	연도	연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 및 관련분야 기술발전의 기여도 (%)
1차년도	2006	<제1 세부과제> 식미 증진에 관여하는 후보 유전자의 유전자형간 변이 해석	식미 증진 후보유전자의 발굴 및 식미군 품종간 변이 분석 및 양식미 품종들간 잡종집단 양성	100
2차년도	2007	<제1 세부과제> 발굴한 식미 관여 후보 유전자들과 품질과의 관계 구명 및 선발표지 개발	식미군과 RIL 집단의 검정을 통한 식미 유전 선발표지 개발 및 양식미 품종들간 잡종집단과 계통 양성	100
3차년도	2008	<제1 세부과제> 식미에 관여하는 유전 선발표지 개발 및 MAS에 의한 계통 선발	자포니카에서 탐색된 QTL, 다른 세부과제에서 동정된 식미관여 유전자와 분자표지를 비교 분석하고, 분자표지 유래 유전자의 silencing을 통한 형질전환체 육성 및 MAS 이용 식미증진 계통 선발	90
4차년도	2009	<제1 세부과제> 식미에 관여하는 유전 선발표지 확립 및 MAS을 이용한 식미증진 계통 육성	식미 분자표지 확립 및 MAS을 이용한 식미증진 계통 육성	100
최종평가		<제1 세부과제> 식미 선발표지 개발과 식미증진 벼 계통 육성	식미 선발표지 확립 및 식미증진 벼 계통 육성	100

<제2세부과제> 저장 단백질 조성 및 함량 조절에 의한 벼 식미 증진

구분	연도	연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 및 관련분야 기술발전의 기여도 (%)
1차년도	2006	배유 저장 단백질 발현 및 안정성 관련 유전자들의 발현 조절	배유 저장 단백질 조절 관련 유전자의 이용 가능성 및 저장 단백질 함량 변화 유도에 이들 유전자의 적합성	100%
2차년도	2007	제조된 벡터를 이용한 형질전환체 벼 생산 및 각 유전자에 대한 loss-of-function 돌연변이 분리	정상적인 형질 전환체 생산과 각 유전자들에 대한 돌연변이가 정상적으로 분리되었는지 검증	95%
3차년도	2008	선별된 형질전환체와 돌연변이 벼에서 저장단백질 함량조사	형질전환체와 돌연변이t에서 단백질 함량 변화 유무 검증	95%
4차년도	2009	저장 단백질 함량 변화에 따른 형질전환체 식미 조사	형질전환체와 돌연변이에서 단백질 함량 변화에 따른 식미 변화 유무 검증	30%
최종평가		저장 단백질 조성 및 함량 조절에 의한 벼 식미 증진	식미변화에 영향을 주는 단백질 동정 및 형질전환체의 식미 증진 검증	80%

<제1협동과제> 전분대사 관여 유전자 발굴과 재조합에 의한 벼 식미증진 계통 개발

구분	연도	연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 및 관련분야 기술발전에의 기여도 (%)
1차년도	2006	<제1 협동과제> 전분대사 중 식미에 관여하는 후보 유전자 발굴 및 형질전환용 벡터제작	전분대사 중 식미에 관여하는 후보유전자 발굴 및 형질전환용 벡터제작	100
2차년도	2007	<제1 협동과제> 식미 관련 유전자 형질전환용 벡터 제작, 형질전환 및 형질전환체 확인	식미 관련 유전자 형질전환용 벡터 제작, 형질전환 및 형질전환체 확인	100
3차년도	2008	<제1 협동과제> 식미 관련 유전자 형질전환, 유전자도입 확인 및 발현 분석	식미 관련 유전자 형질전환, 유전자도입 확인 및 발현 분석	100
4차년도	2009	<제1 협동과제> 유전자 형질전환체 확인, 발현분석, 식미 검정 및 우량 계통 선발	유전자 형질전환체 확인, 발현분석, 식미 검정 및 우량 계통 선발	80
최종평가		<제1 협동과제> 전분대사 관여 유전자 발굴과 재조합에 의한 벼 식미증진 계통 개발	고품질(양식미)와 관련된 전분대사 중 양식미 관여 유전자 발굴 및 유전자 형질전환과 발현조절에 의한 고품질 쌀 개발	80

<제2협동과제> 벼 지질대사 및 대사산물과 식미와의 연관성 분석

구분	연도	연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 및 관련분야 기술발전에의 기여도 (%)
1차년도	2006	<제2 협동과제> Lipoxygenase의 활성 비교 및 작용 결과 생성되는 지질 과산화물의 성분 조성 분석	Crude lipoxygenase 분획제조와 활성도 비교 및 Non-starch lipid 분획의 저장에 따른 지질과산화물 조성 및 함량 비교	100
2차년도	2007	<제2 협동과제> Amylose-lipid 복합체 형성 지방산의 함량과 성분 조성 분석 및 식미와의 관계	Non-starch lipid 분획의 취반 가공 및 저장에 따른 옥타코사놀의 함량 및 성분 조성 분석	100
3차년도	2008	<제2 협동과제> Amylose-lipid 복합체 형성 지방산의 함량과 성분 조성 분석 및 식미와의 관계	Starch lipid 복합체의 구성 지방산 함량과 성분 조성 분석 및 아밀로오스 중합도 비교	100
4차년도	2009	<제2 협동과제> Lipoxygenase 및 microsomal ω -3 fatty acid desaturase 관련 유전자의 발현 조절에 의한 돌연변이 유전자 확보/분석 및 식미와의 관계	종자 lipoxygenase와 ω -3 fatty acid desaturase 전사 활성도 및 종자내 lipoxygenase의 정량 분석과 식미와의 관련성 검토	100
최종평가		<제2 협동과제> 벼 지질대사 및 대사산물과 식미와의 연관성 분석	벼 지질대사 및 대사산물과 식미와의 연관성 분석	100

<제3협동과제> 벼 식미관련 유전자 분석을 위한 지도 작성 및 QTL 분석

구분	연도	연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 및 관련분야 기술발전예의 기여도 (%)
1차 년도	2006	<제3 협동과제> 양식미 관련 유전자 분석을 위한 재조합집단 육성 및 유전자 지도 작성	재조합집단 유전자지도 작성 및 재조합집단의 식미 관련 양적형질 유전자좌 분석	100
2차 년도	2007	<제3 협동과제> 양식미 관련 유전자 고밀도 지도 작성 및 연관 DNA마커 개발	양적형질 유전자좌 분석을 위한 고밀도 유전자지도 작성 및 연관 DNA마커 개발, QTL-NIL 계통육성을 위한 여교잡 집단 육성	100
3차 년도	2008	<제3 세부과제> 양식미 관련 QTL 선발표지 활용 및 QTL-NIL 계통 육성	QTL-NIL 계통육성 및 계통 특성 검정과 QTL-NIL 계통간 교배를 통한 식미관련 유전자 효과 분석 및 유전자 집적	100
4차 년도	2009	<제3 협동과제> 양식미 관련 QTL 활용 체계확립 및 식미증진 중간모본 육성	유망 QTL/NIL 계통 선발, 고품질 중간모본 육성과 국내 대표품종 검증을 통한 QTL 선발표지 확립	100
최종 평가		<제3 협동과제> 벼 식미관련 유전자 분석을 위한 지도 작성 및 QTL 분석	유망 QTL-NIL 계통 선발하고 QTL이 집적된 고품질 중간모본 육성	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

<총괄표>

기술거래	사업화	교육·지도활용	정책활용	타연구에 활용 및 2단계연구에 활용	기타 활용
건	건	건	건	3 건	1 건
특허	논문	학술대회 발표	홍보실적	전시회참가	기타 홍보
2 건 (국내 : 2 건) (국외 : 건)	15 건 (국내 : 11건) (국외 : 4건)	32 건 (국내 : 22건) (국외 : 10건)	건 (국내 : 건) (국외 : 건)	건 (국내 : 건) (국외 : 건)	1 건

* 인력양성: 석박사과정 2명, 박사: 2명 배출

<제1세부과제> 식미 선별표지 개발과 식미증진 벼 계통 육성

1. 논문

가. 학술발표

구두 발표 : 1건

저자	제목	학술회의 명칭	학술회의 개최기간	장소	국명
Puji Lestari, Tae-Ho Ham, Lee Gi An, Ho-Hoon Lee, Mi-Ok Woo, Wenzhu Jiang, Reflinur, Sang-Ho Chu, Soon-Wook Kwon, Rihua Piao, Kyung-Ho Ma, Jeong-Heui Lee, Young-Chan Cho and Hee-Jong Koh	Marker Development for Selection of Improved Eating Quality of Rice	한국육종학회 40주년 기념 심포지엄 및 정기학술발표회	2009.07.01~03	대전	한국

포스터 발표 : 5건

저자명	발표 논문제목	학술대회 명칭 (주관기관)	개최 기간	장소	국가
Puji Lestari, Tae-Ho Ham, Ho-Hoon Lee, Mi-Ok Woo, Wenzhu Jiang, Sang-Ho Chu, Soon-Wook Kwon, KYUNG-HO MA, JEONG-HEUI LEE, Young-Chan Cho and Hee-Jong Koh	PCR Marker-Based Evaluation of Eating Quality of Japonica Rice (OryzasativaL.)	2009 한국작물학회 춘계학술발표회	2009.04.16~17	삼척	한국

Puji Lestari, Gi An Lee, Tae-Ho Ham, Ho-Hoon Lee, Reflinur, Wenzhu Jiang, Mi-Ok Woo, Rihua Piao, and Hee-Jong Koh	Single nucleotide polymorphism and haplotype diversity in the sucrose synthase 3 gene of rice	2008 한국작물학회 추계학술발표회	2008.10.23~24	경주	한국
Puji Lestari, Ho-Hoon Lee, Tae-Ho Ham, Sang-Ho Chu, Soon-Wook Kwon, Wenzhu Jiang, EunByeol Koh, Young-Chan Cho and Hee-Jong Koh	SNP identification and Marker Development for Candidate Genes Contributing to Eating Quality of Japonica Rice	5th International Crop Science Congress & Exhibition	2008.04.14~18	제주	한국
Puji Lestari, Wenzhu Jiang, Ho-Hoon Lee, Sang-Ho Chu, Sun-Wook Kwon and Hee-Jong Koh	Single nucleotide polymorphisms identification and haplotype diversity of sucrose synthase 3 in japonica rice	2007년 한국육종학회 추계학술발표회	2007.07.05~06	천안 상록리 조트	한국
Wenzhu Jiang, Sang-Ho Chu, Ho-Hoon Lee, Young-Il Cho, Donglin Yuan, Longzhi Han, Luyuan Dai, Furong Xu, Jong-Doo Yea and Hee-Jong Koh	Genotypic and environmental variation of agronomic traits associated with cold-tolerance in rice recombinant inbred line	2007년 한국작물학회 추계학술발표회	2007.04.19~ 20	대전 충남 대학교	한국

나. 논문게재

년도	제목	제1저자	교신저자	공동저자	학술지	페이지	구분	SCI
2009	PCR Marker-Based Evaluation of the Eating Quality of Japonica Rice (<i>Oryzasativa</i> L.)	푸지	고희중	함태호, 이호훈, 강문수, 조영찬 등	J.of Agricultural and Food Chemistry	57, 2754-2762	국외	SCI
2008	Comparison of Grain Quality Traits between Japonica Rice Cultivars from Korea and Yunnan Province of China	Teng-Qiong Yu	고희중	강문수, 함태호, 추상호, 푸지, 김명기 등	J.CropSci. Biotech.	11(2):135-140	국내	
2010	Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotype Diversity in Rice Sucrose Synthase 3	푸지	고희중	이 기 안 , 함 태 호 , 레 플 리 , 우 미 옥 , 박일화 등	J Hered.	교정중	국외	SCI

2. 특허: 1 건

- 고희중, 푸지, 함태호, 강문수, 추상호, 권순욱, 이호훈, 우미옥. 자포니카쌀의 식미평가용 마커 및 그의 용도. 출원번호: 특허청 10-2009-0010299 (2009.2.9)

3. 홍보: 1건

-공동심포지엄(제2회 식물유전체육종연구소 심포지엄 / 제5회 한국분자표지연구회 학술행사 / 한국육종학회 젊은육종가협의회 학술행사), “분자표지를 이용한 유전자원 활용기술의 현황과 전망”, 2009년 12월 18일 서울대에서 개최, “PCR-Marker Based Evaluation of the Eating Quality of Rice” 발표하여 분자표지를 활용한 식미 개량 육종의 효용을 홍보.

4. 추가연구에 활용 계획

- 고양식미 벼 품종을 위한 식미 관련인자 분석용 유전자지도 작성 및 QTLs 분석에 의한 마커 개발로 marker-assisted selection(MAS)체계를 확립 함으로써 식미 계통 육성이 초기세대부터 효율적으로 진행될 수 있으며, 이를 벼 육종사업에 직접 활용하며 또한 국공립연구기관에 기술 파급효과 기대. 식량과학원에 정보 제공함(기타 활용).
- 아직 유전자가 밝혀지지 않은 분자마커들은 PCR로 증폭된 염기서열을 이용하여 유전체 분석 기법으로 관여 유전자들을 밝힐 예정이며(타 연구 이용- 작물육종지원사업단), 궁극적으로 식미 관여 유전자를 모두 구명할 예정임.
- 육성한 고품질 식미 우수 계통들은 추후 농업형질을 검토 보강하여 신품종으로 등록할 계획 임.

<제2세부과제> 저장 단백질 조성 및 함량 조절에 의한 벼 식미 증진

1. 논문

가. 학술발표

포스터 발표: 8건

저자명	발표 논문제목	학술대회 명칭 (주관기관)	개최 기간	장소	국가
KIM Yeon Jeong, PARK Bong Soo, Park Youn Jin, SANG Wan Gyu, SON Ga Hyun, YEU Song Yion, KOH Hee Jong and SEO Hak Soo Seo	Identification of the endosperm-specific proteins for rice quality improvement	2007 한국분자 세포생물학회	2007.10.18~19	서울	한국
Soon Ho Choi, Yeon Jeong Kim, Bong Soo Park, Ga Hyun Son, and Hak Soo Seo	Isolation of the quality-related proteins in rice	2008 한국 육종학회 정기학술발표회	2008.07.03~04	대구	한국
Soon Ho Choi, Yeon Jeong Kim, Bong Soo Park, Ga Hyun Son, Song Yion Yeu and Hak Soo Seo	Identification of the endosperm-specific proteins involved in rice grain quality improvement	XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology	2008.08.17~22	Tampere	핀란드

Yeon Jeong Kim, Bong Soo Park, Wan Gyu Sang, Ga Hyun Son, Youn Jin Park, Song Yion Yeu, Hee Jong, Koh and Hak Soo Seo	Identification of the endosperm-specific proteins for rice quality improvement	2008 International Crop Science Congress	2008.04.13~18	제주	한국
Yeon Jeong Kim, Soon Ho Choi, Bong Soo Park and Hak Soo Seo	Identification of the rice quality-related proteins and metabolites	2008 Korea Conference on Innovative Science and Technology	2008.11.17~19	경주	한국
Yeon Jeong Kim, Soon Ho Choi, Ga Hyeon Son, Hee Jeong Eo, Bong Soo Park and Hak Soo Seo	Rice ascorbate peroxidase OsAPxb regulates seed development	2009 한국작물학회 추계학술발표회	2009.10.22~23	광주	한국
Yeon Jeong Kim, Soon Ho Choi, Bong Soo Park, Hee Jong Koh and Hak Soo Seo	Proteomic analysis of the rice seed for quality improvement	2009 한국작물학회 춘계학술발표회	2009.04.16~17	삼척	한국
Yeon Jeong Kim, Soon Ho Choi, Bong Soo Park, Hee Jeong Eo, Jong Tae Song and Hak Soo	Characterization of a protein disulfide isomerase in rice	2009 한국육종학회 40주년 기념 심포지엄 및 정기학술발표회	2009.07.01~03	대전	한국

나. 논문게재

년도	제목	제1저자	교신저자	공동저자	저널	페이지	구분	SCI
2009	Proteomic analysis of the rice seed for quality improvement	Yeon Jeong Kim	Hak Soo Seo	Soon Ho Choi, Bong Soo Park, Jong Tae Song, Min Chul Kim, 등	Plant Breeding	541-550	국외	SCI

2. 인력양성

가. 석박사과정 진입: 김연정(2009.8), 최순호(2009. 8)

3. 추가연구에 활용 계획

- 단백질 변이 형질전환체들을 후속 식미 관련 연구에 재료로 활용 계획 (타 연구 활용)

<제1협동과제> 전분대사 관여 유전자 발굴과 재조합에 의한 벼 식미증진 계통 개발

1. 논문

가. 학술발표

저자명	발표 논문제목	학술대회 명칭 (주관기관)	개최 기간	장소	국가
Ming-Mao Sun, Hye-Jung Lee, Sailila Estilong Abdula, Ung-Han Yoon, Yong-Gu Cho	Difference at Molecular Aspects between japonica Rice Varieties with High and Low Palatability.	CFG2010	2010.04.14 -18	제주	한국
Ming-Mao Sun, Hye-Jung Lee, Sailila Estilong Abdula, Ung-Han Yoon, Young-Chan Cho, and Yong-Gu Cho	Expression of Rice Starch Branching Enzyme 1 (OsSbe1) in Transgenic Rice	CFG2010	2010.04.14 -18	제주	한국
Ming-Mao Sun, Hye-Jung Lee, Yong-Guk Ju, Reneeliza Melgar, Ung-Han Yoon, Yong-Hwan Kim, Yong-Gu Cho	Gene Expression of Starch Branching Enzyme1 (RBE1) in Transgenic Rice	The 6th International Rice Genetics Symposium	2009.11.16 -19	마닐라	필리핀
Ming-Mao Sun, Hye-Jung Lee, Reneeliza Melgar, Hee-Jong Woo, Hong-Sig Kim, Sun-Hee Woo, Yong-Gu Cho	Molecular mechanism of palatability difference in high- and low-quality japonica rice varieties.	The 6th International Rice Genetics Symposium	2009.11.16 -19	마닐라	필리핀
Ming-Mao Sun, Hye-Jung Lee, Reneeliza Melgar, Hee-Jong Woo, Ung-Han Yoon, Yong-wan Kim, Hong-Sig Kim, Sun-Hee Woo, Yong-Gu Cho	Gene expression of rice starch branching enzyme1 in transgenic rice.	Plant Science Conference	2009.10.26 -27	서울	한국
Ming-Mao Sun, Yong-Guk Ju, Reneeliza Melgar, Hye Jung Lee, Hee-Jong Woo, Ung-Han Yoon, Hong-Sig Kim, Sun-Hee Woo, Yong-Gu Cho	Over-expression of rice starch branching enzyme 1 (RBE1) results in low amylose content in brown rice. Plant breeding in Korea: Achievements and prospects.	한국육종학회 40주년 기념 심포지엄 및 정기학술발표회	2009.07.01 ~03	대전	한국
Ming-Mao Sun, Yong-Guk Ju, Reneeliza Jean Melgar, Ung-Han Yoon, Hong-Sig Kim, Sun-Hee Woo, Yong-Gu Cho	Expression of rice starch branching enzyme1 (RBE1) in transgenic rice	2009 한국작물학회 춘계학술발표회	2009.04.16 ~17	삼척	한국
Sun, Mingmao, Reneeliza Jean Melgar, Jin-Hui Park, Ung-Han Yoon, and Yong-Gu Cho	Expression and Vector Constructions of Genes Encoding Enzymes for Starch Biosynthesis in Developing Rice Endosperm	한국육종학회	2008.07.03 -04	대구	한국

Sun, Mingmao, Jin-Heui Park, Jin-Ha Park, Sang-Yoon Park, Jung-Hwan Kim, Woo, and Yong-Gu Cho	Development of High Palatability Rice Through Transformation of Genes related to Starch Synthesis in Rice	5th International Crop Science Congress	2008.04.14-18	제주	한국
Park, Jin-ha, Beom-Heon Song, Kwon-Kyoo Kang, Yong-Gu Cho.	Molecular Cloning and Expression of 1-Sucrose:Sucrose Fructosyltransferase Gene Encoding Fructan Biosynthesis with a Barley 6-SFT Promoter in Rice	5th International Crop Science Congress	2008.04.14-18	제주	한국
Woo Hee-Jong, Lee Si-Myung, Shin Kong-Sik, Lim Sun-Hyung, Cho Hyun-Suk, Kim Dong-Hern, Cho Yong-Gu	Construction of marker-free transgenic tobacco with γ -TMT gene	한국식물학회 한국식물생명공학회 Joint Meeting	2008.07.10-11	부산	한국
Jin-ha Park, Myeong-Yeol Yoon, Jin-Huei Park, Sang-Yun Park, Jung-Hwan Kim, Jae-Yong Woo, Tae-Jung Kim, Beom-Heon Song, Kwon-Kyoo Kang, Yong-Gu Cho	Identification of fructan synthesis gene expression in T4 lines of transgenic rice.	제6회 오송국제심포지엄 제2회 한국식물과학 협의회 심포지엄	2007.11.01-02	청주	한국

나. 논문게재

년도	제목	제1저자	교신저자	공동저자	학술지	페이지	구분	SCI
2010	Difference at Molecular Aspects between japonica Rice Varieties with High and Low Palatabilit	Ming-Mao Sun	조용구	Hye-Jung Lee, Sailila Estilong Abdula, 등	작성중			
2010	Comparison of Grain Quality Traits between Japonica Rice Cultivars from Korea and Yunnan Province of China	Ming-Mao Sun	조용구	Hye-Jung Lee, Sailila Estilong Abdula, 등	작성중			
2010	Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) for Physical and Chemical Properties of Rice Grains	조용구	조용구	Hyeon-Jung Kang, Young-Tae Lee, 등	Plant Biotechnology Reports	4(1): 61-73	국외	SCI
2008	Transgenic Tobacco with γ -TMT of Perilla Showed Increased Salt Resistance and Altered Pigment Synthesis	Woo, Hee-Jong	조용구	성좌경, 김정봉, 김나영, 이시명, 신공식 등	J. Plant Biotechnology	35(4): 29~335	국내	

2.특허출원: 1 건

- 전분가지화효소 유전자의 형질전환 발현에 의한 고식미 벼 계통
: 향후 연구에 활용 계획(타 연구에 활용)

3. 인력양성

가. 학사 : 5 명

- 박상운(2008. 2.), 김정환(2008. 2.), 하치영(2009. 2.), 우재용,(2009. 2), 주용국(2009. 8.)

나. 박사 : 1 명

- Ming-Mao Sun (2010 졸업예정)

<제2협동과제> 벼 지질대사 및 대사산물과 식미와의 연관성 분석

1. 논문게재

년도	제목	제1저자	교신저자	공동저자	학술지	페이지	구분	SCI
2009	Comparative analysis of the physicochemical properties of rice endosperm from different non-glutinous rice varieties	Mi-Young Kang	Sang-Chul Lee	Catherine W. Rico	J. Korean Soc. Appl. Biol	52(6):585-589	국내	
2009	Comparative study of the physicochemical properties of rice endosperm components expressing Sugary-2 mutants in different genetic backgrounds	Mi-Ra Yoon	Mi-Young Kang	Hee-Jong Koh, Sang-Chul Lee	J. Korean Soc. Appl. Biol	52(5):509-515	국내	
2009	Pasting and amylose component characteristics of seven rice cultivars	Mi-Ra Yoon	Mi-Young Kang	Hee-Jong Koh, Sang-Chul Lee	J. Korean Soc. Appl. Biol	52(1):63-69	국내	
2009	브랜드 쌀의 DNA 판별에 의한 혼용율과 식미와의 연관성 비교	김채은	강미영	남연주	한국조리과학회지	25(2):260-265	국내	
2008	식미에 영향을 미치는 쌀 배유조성 지질성분특성변이	윤미라	강미영	고희중	응용생명과학회지	51(3):207-211	국내	
2007	식미에 영향을 미치는 쌀 곡립의 이화학적 특성	윤미라	강미영	고희중, 김채은	한국작물학회지	52(1):45-50	국내	
2006	경북지역 브랜드 쌀의 품질특성	곽영민	강미영	김채은, 손재근	한국작물학회지	51(7):645-651	국내	
2006	쌀 완전립과 불완전립의 이화학적 특성비교	곽영민	강미영	윤미라, 손재근	한국작물학회지	51(7):639-644	국내	

<제3협동과제> 벼 식미관여 유전자 분석을 위한 지도 작성 및 QTL 분석

1. 논문

가. 학술발표

년도	제목	학회	페이지	비고
2006	SSR 마커를 이용한 Japonica 후대집단의 연관지도 작성	한국육종학회	124-125	국내
2006	Linkage map construction and allelic effect of QTL analysis for eating quality in Japonica rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	2회 국제벼학술회의 (인도)	301	국외
2007	Linkage map construction and QTL analysis in the cross between two japonica cultivars	한국육종학회	94	국내
2008	Identification of QTLs associated with eating quality using a RIL population in japonica rice	한국육종학회	75	국내
2009	QTLs analysis for eating quality in temperate japonica rice variety Ilpumbyeo	6회 국제벼유전학회	298	국외
“	QTLs analysis for eating quality using two RIL populations of the crosses between japonica rice varieties	6회 국제벼유전학회	53-54	국외
“	Analysis of quantitative trait loci association with eating quality using a RIL population in japonica rice	6회 국제벼유전학회	177	국외

나. 논문게재

년도	제목	제1저자	교신저자	공동저자	학술지	페이지	구분	SCI
2008	QTL mapping of agronomic traits using an RIL population derived from a cross between temperate japonica cultivars in rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	조영찬	안상낙	권수진, 권순옥, 김연규, 오창식, 신영섭, 서정필 등	Breeding Sci.	58: 271-279.	국외	SCI
2008	QTLs identification and confirmation for field resistance to blast in temperate japonica rice.	조영찬	조영찬	권순옥, 서정필, 김정주, 김연규, 고희종 등	JCSB	11(4): 269-276	국내	일반

2. 품종

‘수원536호’는 지역적응시험에 공시하여 적응성을 평가한 후 품종화 또는 중간모본화를 할 예정이다

3. 인력양성

- 박사학위: 권순옥 (2008. 8)

3. 추가연구에 활용 계획

○ 본 결과에서 얻은 결과를 활용하여 자포니카 고양식미 벼품종육종에서 식미관련 형질에 대한 MAS 체계 확립을 위한 마커 개발을 위한 기본 정보로 활용할 예정이다

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

: 식미관련 마커 개발, 유전자연구, 성분분석, 지도작성, 계통육성 등 모든 분야에 대해 문헌 고찰 및 학술발표회 참가 등에서 확보한 정보들이 이미 연구결과에 포함되어 있음.

제 7 장 참고문헌

- 竹生新治郎. (1995). 米の科學. 朝倉書店. 129-152.
- Aibara, S., Ismail, I. A., Yamashita, H., Sekiyama, F. and Morita, Y. (1986). Changes in rice bran lipids and free amino acids during storage. *Agr. Biol Chem*, 50, 665-673.
- Arruzazabala M. L., Carbajal, D. Mas R, Molina V, Valades S, and Laguna A. (1994). Cholesterol-lowering effects of policosanol in rabbits. *Biol Res* 27, 205-208.
- Azhakanandam, K., Power, J. B. and Lowe, K. C. (2000). Qualitative assessment of aromatic Indica rice *oryza sativa* L., Proteins, lipids and starch in grain from somatic embryo- and seed-derived plants. *J. Plant Physio.* 156, 783-789.
- Banks, W., Greenwood, C. T. and Muir, D. D. (1971). The characterization of starch and its components.III. The technique of semi-micro differential potentiometric iodine titration and factors affecting it. *Staerke*. 23, 118-124.
- Banks, W., Greenwood, C. T. and Thomson, J. (1959). The properties of amylaseas related to the fractionation and subfraction of starch .*Macromol. Chem.* 31, 197-213
- Bao JS, Shen SQ, Sun M, Corke H (2006a) Analysis of genotypic diversity in the starch physicochemical properties of nonwaxy rice: apparent amylose content, pasting viscosity and gel texture. *Starch* 58: 259-267.
- Bao JS, Corke H, Sun M (2006b) Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice(*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1171-1183.
- Basten, C.J., B.S. Weir and Z.B. Zeng (1997). 1997: QTL Cartographer: a Reference Manual and Tutorial for QTL Mapping. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.
- Bechtel, D. B. and Pomeranz, Y. (1977). Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis. The caryopsis coat and aleurone cells. *American Journal of Botany*. 64, 966 - 973.
- Bhattacharya, K. R., Sowbhagya, C. M. and Indudhara Swamy, Y. M. (1982). Quality profile of rice, A tentative scheme for classification. *J. Food Sci.*, 47, 564.
- Bhattacharya, K. R., Sowbhagya, Y. M., and Indudhara Swamy, C. M. (1978). Importance of insoluble amylose as a determinant of rice quality. *J. Sci. Food. Agri.* 29, 359-364.
- Bienvenido O. Juliano, C. M. P. (1983). "Major factors affecting cooked milled rice hardness and cooking time." *Journal of Texture Studies* 14(3):235-243.
- Biliaderis, C. G., Maurice, T. J. and Vose, J. R. (1980). Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.*, 45(6), 1669-1674.
- Blanshard, J. M. V. (1987). Starch granule structure and function : A physicochemical approach in starch properties and potential (ed) : by Galliard, T., John Willey and sons Ltd., Ch 2, 16, 54.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998). Mini review. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol*, 23, 85-112.
- Cagampang GB, Perez CM, Juliano BO (1973) A gel consistency test for eating quality in rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24: 1589-1594.
- Causse, M.A., T.M. Fulton, Y.G. Cho, S.N. Ahn, J. Chunwongse, K. Wu, J. Xiao, Z.H. Yu, P.C. Ronald, S.E. Harrington, G. Second, S.R. McCouch and S.D. Tanksley (1994). Saturated

- molecular map of the rice genome based on an intraspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
- Chae, J. C. (2004). Present situation, research and prospect of rice quality and bioactivity in Korea. *Food Science and Industry*. 37(2), 47-54.
- Champagne, E. T., Marshall, W. E. and Goynes, W. R (1990). Effects of degree of milling and lipids removal on starch gelatinization in the brown rice kernel. *Cereal Chem*, 67(6), 570
- Charnpagne, E. T., Marshall, W. E., and Goynes, W. R. (1990). Effects of degree of milling and lipids removal on starch gelatinization in the brown rice kernel. *Cereal Chem*. 67(6), 570.
- Chen JG, Zhu J (1999) Genetic effects and genotype×environment interactions for cooking quality traits in indica-japonicacrosses of rice(*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 109: 9-15.
- Chen N, Luo YK, Xie LH, Zhu ZW, Duan BW, Zhang LP (2006) Protein content and its correlation with other quality parameters of rice in China. *Acta Agronomica Sinica* 32(8): 1193-1196.
- Chinnaswamy, R., and Bhattacharya, K. R. (1986). Characteristics of gel- chromatographic fractions of starch in relation to rice and expended rice product qualities. *Starch*, 38, 51-57.
- Cho, E. J. and Kim, S. K. (1990). Changes in physicochemical properties of brown and milled rice during storage. *Korean, J, Agric. Chem. Biotechnol.*, 31(1), 24-33.
- Cho, Yong-Gu, Hyung-Keun Kim, Jang-Sun Choi, Yu-Jin Jung, and Kwon-Kyoo Kang (2009) Iron Fortification of Grains by Introducing A Recombinant Gene of Ferritin with Seed Promoters in Rice. *Korean J. Plant Biotechnology* 36(1): 87-95.
- Choi, H. C. (2002). Current status and perspectives in varietal improvement of rice cultivars for high-quality and value-added products. *Korean J. Crop Sci*. 47, 15-32.
- Choi, H. C., Cho, S. Y. and Kim, K. H. (1990). Varietal difference and environmental variation in protein content and/or amino acid composition of rice seed. *Korean J. Crop Sci*. 35(5), 379-386.
- Choi, H. T., Lee, S. H., Yang R, and Oh, D. W. (1988). Effect of defatting and reincorporation with fatty acid on the physicochemical characteristics of rice starch. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 20(6), 834-839.
- Choudhury, N. H. and Juliano, B. O. (1980). Effect of amylose content on the lipids of mature rice grain. *Phytochemistry*, 19, 138-1389.
- Conde-Petit, B. and Escher, F. (1994). Influence of starch-lipid complexation on the ageing behaviour of high concentration starch gels. *Starch/Stärke*, 46(5), 172-177.
- Daryl, B. Lund. (1983). Application of differential scanning calorimetry in foods. in 'Physical properties of foods' ed. by Micha Peleg. Avi publishing company. Inc., 132.
- Dian WM, Jiang HW, Chen QS, Liu FY, Wu P (2003) Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm. *Planta* 218: 261-268.
- Dian WM, Jiang HW, Wu P.(2005) Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. *J Experimental Botany* 56(412): 623-632.
- Digeon, J., E. Guiderdoni, R. Alary, N. Michaux-ferriere, P. Joudrier and M. Gautier (1999). "Cloning of a wheat puroindoline gene promoter by IPCR and analysis of promoter regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds." *Plant molecular biology* 39(6):1101-1112.
- Eliasson, A. C. (1985a). Starch gelatinization in the presence of mulsifiers: A morphological study of wheat starch. *Staerke*,. 37, 741.
- Eliasson, A. C. (1985b). Starch-lipid interactions studied by differential scanning calorimetry.

- Thermochimica acta, 95(2), 369-374.
- Englyst, H. N., Michael, E. Q., Hudson, G. J., and Cummings, J. H. (1992). Determination on dietary fibre as non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Analyst*, 117, 1707-1714.
- Factor, V. M., Laskowska, D., Jensen, M. R., Weitach, J. T., Popescu, N. C., and Thorgeirsson, S. S. (2000). Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97(5), 2196-2201.
- French, D. (1984). Organization of starch granules. In *Starch Chemistry and Technology* (2nd ed.). Whistler, R. L., Bemiller, J. N. and Paschall, E. F.(ed.), Academic Press, New York. 183-247.
- Fujita N, Toyosawa Y, Utshinori U, Higuchi T, Hanashiro I, Ikegami A, Akuzawa S, Yoshida M, Mori A, Inomata K, Itoh R, Miyao A, Hirochika H, Satoh H, Nakamura Y. (2009) Characterization of pullulanase(PUL)-deficient mutants of rice(*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm. *Journal of Experimental Botany* 60(3): 1009-1023.
- Fujion, Y., Sakata, S., and Nakano, M. (1974). Cereboside in rice grain. *J. Food Sci.*, 39, 471.
- Fukuoka, S., N. Saka, H. Koga, K. Ono, T. Shimizu, K. Ebana, N. Hayashi, A. Takahashi, H. Hirochika, K. Okuno, M. Yano (2009) Map-based cloning and molecular breeding of pi21, a non-race specific resistant gene to blast. In *Proceeding of 6th International Rice Genetics Symposium*, Nov. 16-18, 2009, Manila, Philippines, pp. 61.
- Gao ZY, Zeng DL, Cui X, Zhou YH, Yan MX, Huang DN, Li JY, Qian Q (2003) Map-based cloning of the ALK gene, which controls the gelatinization temperature of rice. *Science in China(Series C)* 46(6): 661-668.
- Ghiassi, K., Hosney, R. C. and Varriano-Marston, E. (1982). Gelatinization of wheat starch. I. Excess-water Systems, *Cereal Chem.*, 59, 81.
- Ghiassi, K., Hosney, R. C. and Varriano-Marston. E. (1982). Gelatinization of wheat starch. III. Comparison by differential scanning calorimetry and light microscopy. *Cereal Chem.*, 59(4), 258.
- Ghiashi, K., Varriano-Marston, E. and Hosney, R. C. (1982). Gelatinization of wheat starch. IV. Amylography viscosity. *Cereal Chem.* 59, 262-265.
- Goshima, G., Abe, M., Ohashi., and Tsuge, H. (1985). Amylographic reproducibility of defatted potato starch by the reintroduction of lipid. *Starch*. 37, 10.
- Ha, K. Y., Yoon, H. C., Chung, J. I., Noh, G. I., Ko, J. K., Ree, J. K. and Kim, C. K. (2006). Effect of appearance, viscosity and texture characteristics on rice palatability in some rice varieties. *Korean J. Crop Sci.* 51, 21-24.
- Hamaker, B. R. Griffin, V. K. and Moldenhauer, K. A. K. (1991). Potential influence of a starch granule-associated protein on cooked rice stickiness. *J. Food Sci.* 56(5), 1327-1329.
- Hamaker, B. R. and V. K. Griffin (1993). "Effect of disulfide bond-containing protein on rice starch gelatinization and pasting." *Cereal chemistry* 70:377-380.
- Hansen, L. M., Hosney, R. C. and Faubion, J. M. (1991). Oscillatory rheometry of starch-water systems: Effect of starch concentration and temperature. *Cereal Chem* 68, 347.
- Hayakawa, T., Seo, S.W. and Igaue, I. (1980). Electron microscopic observation of rice grain. I. Morphology of rice starch. *J. Jap Soc Starch Sci.*, 27, 173-179.
- He Y, Han YP, Jiang L, Xu CW, Lu JF, Xu ML (2006) Functional analysis of starch-synthesis genes in determining rice eating and cooking qualities. *Mol Breed* 18:277 - 290
- Hibi, Y., Kitamura, S. and Kuge, T. (1990). Effect of lipids on the retrogradation of cooked rice.

- Cereal Chem., 67, 7.
- Hildebrand, D. F. and Kito, M. (1984). Role of lipoxygenase in soybean seed protein quality. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 815.
- Hildebrand D. F., Versluys R. T., and Collins G. B. (1991). Change in lipoxygenase isozyme levels during soybean embryo development. *J Plant Science* 75, 1-8.
- Hizukuri, S. (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Res.* 147, 342-347.
- Hizukuri, S., Fujii, M. and Nikuni, Z. (1961). Effect of temperature during germination on the crystalline type of starch in soybean seedlings. *Nature.* 192, 239-244.
- Hizukuri, S., Kaneko, T., and Yakeda, Y. (1983). Measurement of the chain length of amylopectins and its relevance to the origin or crystalline polymorphism of starch granules. *Biochimica et Biophysica Acta.* 760, 188-191.
- Hizukuri, S., Takeda, Y., Maruta, N., and Juliano, B. O. (1989). Molecular structure of rice starch. *Carbohydrate Res.* 189: 227-235.
- Hong HC (2006) Studies on the degree of polymerization of amylopectin and eating quality characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). PhD dissertation. Dongguk University, Korea, pp.1-142.
- Hoover, R. and Hadziyev, D. (1981). Characterization of paste starch and its monoglyceride complexes. *Starch.* 33, 290.
- Huang YS, Sun ZX, Hu PS, Tang SQ (1998) Present situation and prospects for the research on rice grain quality forming. *Chinese J Rice Sci* 12(3): 172-176.
- Hwang DY (1992) Relationship between eating quality and its related characteristics of rice grain in breeding lines. MS dissertation. Konkuk University, Korea, pp. 1-26.
- Imberty, A. and Perez, S. (1989). Conformational analysis and molecular modeling of the branching point of amylopectin. 11, 177-185.
- Ishima, T., Taira, H., and Mijoshihara, K. (1974). Effect of nitrogenous fertilizer application and protein content in milled rice on organoleptic quality of cooked rice. *Report of National Food Research Institute* 29, 9-15.
- Juliano BO (1971). A simplified assay for milled rice amylose. *Cereal Sci. Today* 16: 334-336.
- Juliano, B. O. (1985). Polysaccharide, proteins, and lipids of rice. In *Rice chemistry and technology*. The American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, USA. 59-120.
- Juliano, B. O (1992). Rice starch properties and grain quality. *J. Jap. Starch Soc. Sci.*, 39, 11.
- Juliano BO (1998) Varietal impact on rice quality. *Cereal Food World* 43: 207-211, 214-216, 218-222.
- Juliano, B. O. and Bechtel, D. B. (1985). The rice grain and its gross composition. In *Rice ; Chemistry and technology*, Juliano, B. O. (ed.), American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, U. S. A. Ch2, 17-57.
- Juliano, B. O., Onate, L. U. and Del Mundo, A.M. (1965). Relation of starch composition, protein content, and gelatinization temperature to cooking and eating qualities of milled rice. *Food Technol.* June. 116-121.
- Kabir, Y. and Kimura, S. (1995). Tissue distribution of (8-14)-octacosanol in liver and muscle of rats after serial administration. *Ann Nutr Metab*, 39, 279-284.
- Kainuma, K. and French, D. (1972). Naegeli amyloextrin and relationship to starch granule structure. II. Role of water in crystallization of B starch. *Biopolymer*, 11, 2241.
- Kaur, K. and Singh, N. (2000). Amylose-lipid complex formation during cooking of rice flour. *Food*

Chem. 71, 51 - 517.

- Kawashima, K. and Kiribuchi, T. (1980). Studies on lipid components and heat dependent pasting behaviour of non-waxy and waxy rice starches. *Kaseigaku Zasshi*, 31, 625-628.
- Kim, C. E., Sohn, J. K. and Kang, M. Y. (2007). Relationship between palatability and physicochemical properties of carbohydrate components in rice endosperm. *Korean J. Crop Sci.* 52, 421-428.
- Kim, H. S. and Kim, Y. A. (1991). The sensory properties and lipid contents of cooked rices depend on the variety and cooker. *Korean J. Soc. Food Sci.* 7(2), 1-6
- Kim, K. H. and Ahn, J. K. (1997). Classification of grain type and marketing grades for Korea rice varieties, *Korean J. Crop Sci.* 42(3), 357-366.
- Kim, K. J. and Rhee, C. O. (1997). Lipoxygenase activity of milled fraction from brown rice, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(1), 145-149.
- Kim, K. S., Kang, K. J. and Kim, S. K. (1991). Relationship between hot water solubles of rice and texture of cooked rice. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23(5), 496-502.
- Kim, S. K., B. S. Chang, and S. J. Lee. (1996). Ultrastructure of compound starch granules and protein bodies of starchy endosperm cell in rice. *Agr Chem Biotechnol.* 39(5), 379-383.
- Kim, Y. H. (2004). Purification and biochemical analysis of rice bran lipase enzyme. *J. Plant Biotechnol.*, 6, 63-67.
- Kitahara, K., Suganuma, T. and Nagahama, T. (1994). Bound free fatty acids in glucoamylase-digested starches of corn and sweet potato. *Cereal Chem.*, 71, 439-443.
- Lagarda, M. J., Garcia-Llatas, G., and Farre, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *J Pharmaceut Biomed.*, 41, 1486-1496.
- Kobayashi, A., B. Genliang, Y. Shenghai and K. Tomita (2007). Detection of quantitative trait loci for white-back and basal-white kernels under high temperature stress in japonica rice varieties. *Breeding Sci.* 57: 107-116.
- Kosambi, D.D. (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12:172-175.
- Lanceras, J., Z. Huang, O. Naivikul, A. Vanavichit, V. Ruanjaichon and S. Tragoonrun (2000). Mapping of genes for cooking and eating qualities in Thai Jasmine rice (KDML105). *DNA Res.* 7: 93-101.
- Lander, E.S., P. Gren, J. Abragamson, A. Baarlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 :174-181.
- Leach, H. W., McCowen, L. D. and Thomas, C. J. (1959). Structure of the starch granule I. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chem.* 36, 534-544.
- Lestari P, Ham TH, Lee HH, Woo MO, Jiang WZ, Chu SH, Kwon SW, Ma KH, Lee JH, Cho YC, Koh HJ (2009) PCR marker-based evaluation of the eating quality of japonica rice (*Oryza sativa* L.). *J Agric Food Chem* 57: 2754-2762.
- Lee, Y. E. (1987). Physicochemical factors affecting and eating quality of non-waxy rice. PH. D. thesis, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.
- Lee, J.S., W.G. Ha, J.K. Chang, K.L. Ryu, Y.C. Song, N.B. Park, O.K. Kwon, S.J. Yang and H.S. Suh (2004). Estimation of genetic parameters for eating quality in japonica rice. *Korean J. Breed.* 36 (Suppl 2): 222-223

- Leelavathi, K., Indrani, D. and Sidhu, J. S. (1987). Amylograph pasting behavior of cereal and tuber starches. *Starch*, 39(11), 378.
- Li, J. Y. and Yeh, A. I. (2001). Relationship between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. *J. Food Eng.* 50, 141-148.
- Lihong, X., Neng, C., Binwu, D., Zhiwei, Z. and Xiyuan, L. (2008). Impact of proteins on pasting and cooking properties of waxy and non-waxy rice. *J. Cereal Sci.* 47, 372-379.
- Li, X., Y. Wu, D. Z. Zhang, J. W. Gillikin, R. S. Boston, V. R. Franceschi and T. W. Okita (1993). "Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process." *Science* 262(5136):1054-1056.
- Lim, H. S., Shin, J. H., Lim, D. H., and Lim, H. S. (1999). Comparison of protein extraction solutions for rice starch isolation and effects of residual protein content on starch pasting properties. *Starch*, 51, 120-125.
- Little, R. R. and Dawxon, E. H. (1960). Histology and histochemistry of raw and cooked rice kernels. *Food Res.*, 25, 611.
- Little RR, Hilder GB, Dawson EH (1958) Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. *Cereal chemistry* 35: 111-126.
- Li, Z., J. Wan, J. Xia and M. Yano (2003). Mapping of quantitative trait loci controlling physico-chemical properties of rice grains (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 53: 209-215.
- Lorenz, K. (1976). Physicochemical properties of lipid-free cereal starches, *J. Food Sci.*, 41, 1357.
- Loyd J. B. and Whelan W. J. (1969). An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. *Anal Bio chem* 30, 467-470.
- Luh., B. S. and Liu., Y. K. (1991). Rice flours in baking. In *Rice. Vol. II. Utilization.* 2nd Ed. ed by Luh BS. Avi Book. 10.
- Maningat, C. C. and Juliano, B. O. (1980). Starch lipids and their effect on rice starch properties. *Stärke*, 32, 76.
- Matuzaki, A., Takano, T., Sakamoto, S., and Kubiyama, T. (1992). Relation between eating quality and chemical components in milled rice and amino acid contents in cooked rice. *Jpn. J. Crop Sci.* 61, 561-567.
- Matveev, Y. I., van Soest, J. J. G., Nieman, C., Wasserman, L. A., Protserov, V. A., Ezernitskaja, M. and Yuryev, V. P. (2001). The relationship between thermodynamic and structural properties of low and high amylose maize starches. *Carbohydr Polym.* 44, 151-160.
- Matsushita, S., T. Ileri, Y. Fukuta, E. Araki, S. Kobayashi, M. Osaki, M. Yamagishi (2003). Characterization of segregation distortion on chromosome 3 induced in wide hybridization between indica and japonica type rice varieties. *Euphytica* 134: 27-32
- Marshall, S., J. Putterill, K. Plummer and R. Newcomb (2003). "The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*." *Journal of molecular evolution* 57(5):487-500.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein (2002). Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.*9: 199-207.
- Mysers AM, Morell MK, James MG, Ball SG (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 122: 989-998.
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., and Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses.

- Prog. Lipid Res. 41, 457-500.
- Morita, S., H. Kaminaka, T. Masumura and K. Tanaka (1999). "Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling." *Plant and Cell Physiology* 40(4):417.
- Morris, V. J. (1990). Starch gelation and retrogradation. *Trends Food Sci. Technol.* 1, 2.
- Morrison, W. R., Tester, R. F., Snape, C. E., Law, R., and Gidley, M. J., (1993). Swelling and gelatinization of cereal starches. IV. Some effects of lipid-complexed amylose and free amylose in waxy and normal barley starches. *Cereal Chem.*, 70, 385-391.
- Muench, D. G., Y. Wu, Y. Zhang, X. Li, R. S. Boston and T. W. Okita (1997). "Molecular Cloning, Expression and Subcellular Localization of a BiP Homolog from Rice Endosperm Tissue." *Plant Cell Physiology* 38(4):404-412.
- Muntz, K. (1998). "Deposition of storage proteins." *Plant molecular biology* 38(1):77-99.
- Nakamura Y (2002) Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: Rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiology* 43: 718-725.
- Nakamura Y, Francisco Jr PB, Hosaka Y, Sato A, Sawada T, Kubo A, Fujita N (2005) Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indicarice varieties. *Plant Molecular Biology* 58: 213-227.
- Nakase, M., N. Aoki, T. Matsuda and T. Adachi (1997). "Characterization of a novel rice bZIP protein which binds to the γ -globulin promoter." *Plant molecular biology* 33(3):513-522.
- Nike, L., Adrien, D., Dominique, L. D., Eric, M., Yvan, L. and Marc, M. (2004). The oleate/palmitate ratio allows the distinction between whole meals of spelt (*Triticumspelta*L.) and winter wheat (*T.aestivum*L.). *J. Cereal Sci.* 39, 413-415.
- Nishiba, Y., Sato, T. and Suda, I. (2000). Convenient method to determine free fatty acid of rice using thin-layer chromatography and flame-ionization detection system. *Cereal Cem.*, 77, 223-229.
- Ogawa, W., Kumamaru, T. and Satoh, H. (1989). Mutants of rice storage proteins. Isolation and characterization of protein bodies from rice mutants. *Theoretical and applied genetics*, 78, 306-309.
- Ohdan T, Francisco PB, Sawada T, Hirose T, Terao T, Satoh H, Nakamura Y (2005) Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *Journal of Experimental Botany* 56(422): 3229-3244.
- Ohta, H., Aibara, S., Yamashita, H., Sekiyama, F. and Morita, Y. (1990). Post-harvest drying of fresh rice grain and its effects on deterioration of lipids during storage. *Agr Biol Chem.*, 54, 1157-1164.
- Ohsubo, K. Nakamura, S. Okadome, H. Investigation on estimation of rice palatability by DNA analysis (studies on estimation of rice palatability by DNA analysis part I). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 2003, 50, 122-132.
- Ohtsubo, K. Nakamura, S. Variety identification of rice (*Oryza sativa* L.) by Polymerase Chain Reaction method and its application to processed rice products. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1501-1509.
- Okadome, H., Toyoshima, H., and Ohtsubo, K. (1998). Evaluation of gelatinization properties of rice grains with a Rapid Visco Analyser. 48th Annual RACI. *Cereal Chem.*, 545-552.

- Ong, M. H. and J. M. V. Blanshard. (1995). The significance of starch polymorphism in commercially produced parboiled rice. *Starch/Stärke* 47(1), 7-13.
- Ong MH, Blanshard JMV (1995a) Texture determinants in cooked, parboiled rice. I. Rice starch amylose and the fine structure of amylopectin. *Journal of Cereal Science* 21: 251-260.
- Ong MH, Blanshard JMV (1995b) Texture determinants in cooked, parboiled rice. II. Physicochemical properties and leaching behavior of rice. *Journal of Cereal Science* 21: 261-269.
- Panaud O, X. Chen and S.R. McCouch (1996). Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L). *Mol. Gen. Genet.* 252: 597-607.
- Park, M. (2005). Korea's counter-Strategy on WTO/DDA rice negotiation and delayed tariffication. *J. Kor Res Soc Customs.* 6(1), 189-191.
- Piggott JR, Morrison WR and Clyne J. (1991). Changes in lipids and in sensory attributes on storage of rice milled to different degrees. *Int J Food Sci Technol.*, 26, 615-628.
- Piironen, V., D. G. Lindsay, T. A. Miettinen, J. Toivo and A. M. Lampi. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 80, 939-966.
- Pomeranz Y. (1992). Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. In *Storage of Cereal Grains and Their Products*. American Association of Chemists, St Paul, MN, USA. 55-141.
- Prabhu, A. V., Tambo, S. P, Gandhi, N. N., Sawant, S. B., and Joshi, J. B. (1999). Rice bran lipase: extraction, activity, and stability. *Biotechnol. Prog.* 15, 1083-1089.
- Pravisani, C. I., Califano, A. N., and Calvelo, A. (1985). Kinetics of starch gelatinization in potato. *J. Food Sci.*, 50, 657.
- Ramesh, M., Zakiuddin Ali, S. and Bhattacharya, K. R. (1999). Structure of rice starch and its relation to cooked-rice texture. *Carbohydr Polym.* 38, 337-347.
- Raphadlides, S. and Karkalas, J. (1988). Thermal dissociation of amylose-fatty acid complexes, *Carbohydr Res*, 172, 65.
- Reddy KR, Ali SZ, Bhattacharya KR (1993) The fine structure of rice starch amylopectin and its relation to the texture of cooked rice. *Carbohydrate Polymers* 22: 267-275.
- Roach, R. R., and Hosoney, R. C. (1995). Effect of certain surfactants on the swelling, solubility and amylograph consistency of starch. *Cereal Chem*, 72, 571-577.
- Roy, L. W., N. B. James, and F. P. Eugene. (1984). In *starch : Chemistry and technology*, 2nd ed. Academic press Inc. 188-193.
- Rutschmann, M. A. and Solms, J. (1990). Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds II. Study of ligand binding in binary model systems with decanal, 1-naphatol, monostearate and monopalmitate. *Food Sci & Technol.*, 23, 70.
- Sachiko, F., Kunisuke, T., Takehiro, M., Yasunari, O., Yoshifumi, K. and Yoshinori, W. (2006). Influence of Rice Proteins on Eating Quality of Cooked Rice and on Aroma and Flavor of Sake. *Cereal Chem.*, 83(4), 439-446.
- Sandhya Rani M. R. and Bhattacharya K. R. (1995). Microscopy of rice starch granules during cooking. *Starch* 46, 334-337.
- Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y, Sakurai A, Fujita N, Nakamura

- Y (2003) Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiology* 133: 1111-1121.
- Seo, J. W., J. H. Jeong, C. G. Shin, S. C. Lo, S. S. Han, K. W. Yu, E. Harada, J. Y. Han, and Y. E. Choi. (2005). Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation. *Phytochemistry*. 66, 869-877.
- Shen P, Qian CR, Jin ZX, Luo QX, Jin XY (2006) Relationship between variation in activities of key enzymes related to starch synthesis during grain filling period and quality of eating and cooking in rice. *Rice Science* 13(1): 43-50.
- Shi, Y. C. and Seib, P. A. (1992). The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. *Carbohydr Res* 227, 131-145.
- Shu QY, Wu DX, Xia YW, Gao MW, Anna MC (1998) Relationship between RVA profile character and eating quality in *Oryza sativa* L. *Scientia Agricultura Sinica* 31(3): 25-29.
- Shibuya, N. (1990). Chemical structure of cell walls of rice grain and grain quality. *Nippon ShokuhinKogyo Gakkaishi*, 37(9), 740-748.
- Shibuya, N., Iwasaki, T., Yanase, H. and Chikubu, S. (1974). Studies on deterioration of rice during storage. I. Changes of brown rice and milled rice during storage, *J. Jap Soc. Food Sci. Technol.*, 21, 597-603.
- Shin, M. G., Rhee, J. S. and Kwon, T. W. (1985). Effects of amylase activity on changes in amylogram characteristics during storage of brown rice. *Agric. Biol. Chem.*, 49(8), 2505-2508.
- Shinomia, M., Morisaki, N. Matsuoka, N., Izumi, S. and Morita, S. (1983). Effects of γ -oryzanol on lipid metabolism in rats fed high-cholesterol diet. *Tohoku J. Exp. Med.*, 141, 191-197.
- Shoji, I., and Kurasawa, H. (1981). On the viscosity of rice and rice starch by Brabender amylogram III. The viscosity changes of the brown rices (glutinous, non-glutinous rices) stored for some periods in room temperature. *Kaseigaku Zasshi*, 32, 350-355.
- Singh, V. (1998). Rice research finds no takers in the developed world. *The Economic Times*, 12 December, India.
- Smith AM (1999) Making starch *Cur Opin Plant Biol* 2: 223-229.
- Smith AM, Denyer K, Martin C (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 67-87.
- Son, J. R., Kim, J. H., Lee, J. I., Youn, Y. H., Kim, J. K., Hwang, H. G. and Moon, H. P. (2002). Trend and further research of rice quality evaluation. *Korean J. Crop Sci.* 47, 33-54.
- Sterling C. (1978). Texture qualities and molecular structure of starch products. *J. Texture Studies* 9, 225.
- Suh JP, Choi YH, Kim KJ, Cho YC, Kwon SJ, Jeong YP, Jeung JU, Choi IS, Kim YG, Choi HC, Hwang HG. 2004. Genetic diversity and QTLs for grain quality in japonica rice. *Korean J. Breed.* 36: 31-37
- Suh, J.P., Y.C. Cho, S.J. Kwon, I.S. Choi, H.C. Hong, Y.G. Kim, S.N. Ahn and H.G. Hwang (2006). Identification of QTLs for grain quality on RIL population derived from a cross between japonica rices. *Korean J. Breed.* 38: 105-112.
- Sun P (1998) Can the high protein content reduce the tasting quality of rice? Analyze the argument between the rice tasting quality and whether or not application of fertilizers in rice production and marketing sectors of Japan. *China Rice* 5: 31-33.
- Tabata, M., H. Hirabayashi, Y. Takeuchi, I. Ando, Y. Iida and R. Ohsawa (2007). Mapping of quantitative trait loci for the occurrence of

- white-back kernels associated with high temperatures during the ripening period of rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Sci.* 57: 47-52.
- Takahashi, S. and Seib, D. A. (1988). Paste and gel properties prime corn and wheat starches with and without matice lipoids. *Cereal Chem.*, 65, 475.
- Takeda, Y., (1992). Maruta, N. and Hizukuri, S. Structure of amylose subfractions with different molecular size. *Carbohyd. Res.* 226, 279.
- Takeda, Y., Hizukuri, S., and Juliano, B. O. (1987). Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine *Carbohydrate Res.* 168, 79-88.
- Takeda, Y., Hizukuri, S., and Juliano, B. O. (1989). Structures and amount of branched molecules in rice amylose. *Carbohydrate Res.* 186, 163-168.
- Takeda, Y., Maruta, N. and Hizukuri, S. (1992). Structure of amylose subfractions with different molecular sizes. *Carbohydrate. Res.*, 226, 279.
- Takeda, Y., Shibahara, S., and Hanashiro, I. (2003). Examination of the structure of amylopectin molecules by fluorescent labelling. *Carbohydrate Research*, 338, 471 - 475.
- Takemoto, Y., S. J. Coughlan, T. W. Okita, H. Satoh, M. Ogawa and T. Kumamaru (2002). "The rice mutant *esp2* greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase." *Plant Physiol* 128(4):1212-1222.
- Takeuchi, Y., T. Ebitani, T. Yamamoto, H. Sato, H. Ohta, H. Hirabayashi, H. Kato, I. Ando, H. Nemoto and T. Imbe (2006). Devalopment of isogenic lines of rice cultivar Koshihikari with early and late heading by marker-assisted selection. *Breeding Sci.* 56: 405-413.
- Takeuchi Y, Y. Nonoue, T. Ebitani, K. Suzuki, N. Aoki, H. Sato, O. Ideta, H. Hirabayashi, M. Hirayama, H. Ohta, H. Nemoto, H. Kato, I. Ando, K. Ohtsubo, M. Yano and T. Imbe (2007). QTL detection for eating quality including glossiness, stickiness, taste and hardness of cooked rice. *Breeding Sci.* 57: 231-242.
- Tanaka, K., Sugimoto, T., Ogawa, M. and Kasai, Z. (1980). Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.*, 44(7), 1633-1639.
- Tanaka N, Fujita N, Nishi A, Satoh H, Hosaka Y, Ugaki M, Kawasaki S, Nakamura Y (2004) The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. *Plant Biotechnology Journal* 2: 507-516.
- Tanaka, I., A. Kobayashi, K. Tomita, Y. Takeuchi, M. Yamagishi, M. Yano, T. Sasaki and H. Horiuchi (2006). Detection of quantitative trait loci for stickiness and appearance based on eating quality test in japonica rice cultivar. *Breed. Sci.* 8:39-47.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayer, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii and S.R. McCouch (2000). Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L): Frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. *Theor. Appl. Genet.* 100: 697-712.
- Tester, R. F., and Morrison, W. R. (1990a). Swelling and gelatinization of cereal starches : I. Effect of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chem.* 67, 551-557.
- Tester, R. F. and Morrison, W. R. (1990b). Swelling and gelatinization of cereal starches : II. Waxy rice starches. *Cereal Chem.* 67, 558-563.
- Tian ZX, Qian Q, Liu QQ, Yan MX, Liu XF, Yan CJ, Liu GF, Gao ZY, Tang SZ, Zeng DL, Wang YH, Yu JM, Gu MH, Li JY (2009) Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. *PNAS* 106(51): 21760-21765.

- Tomlinson K, Denyer K (2003) Starch synthesis in cereal grains. *Advances in Botanical Research* 40: 1-61.
- Uwer, U., L. Willmitzer and T. Altmann (1998). "Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development." *The Plant Cell Online* 10(8):1277.
- Villareal, C. P., Maranville, J. W. and Juliano, B. O. (1991). Nutrient content and retention during milling of brown rice from the International Rice Research Institute. *Cereal Chem.* 68, 437-440.
- Wada, K., Takahashi, K., Shirai, K. and Kawamura, A. (1979). A differential thermal analysis (DTA) applied to examining gelatinization of starches in foods. *J.Food Sci.* 44, 1366-1372.
- Wada, T., T. Ogata, T. Masao and Y. Matsue (2007) Identification of QTLs for eating quality of cooked rice of 'Koshihikari'. *Breed. Res.* 9 (Suppl. 1): 181
- Wada, T., Y. Uchimura, T. Ogata, M. Tsubone and Y. Matsue (2006). Mapping of QTLs for physicochemical properties in japonica rice. *Breeding Sci.* 56: 253-260.
- Wada T, Ogata T, Tsubone M, Uchimura Y, Matsue Y (2008) Mapping of QTLs for eating quality and physicochemical properties of the japonica rice 'Koshihikari'. *Breeding Science* 58: 427-435.
- Wang, L., and Seib, P. A.(1996). Australian salt-noodle flours and their starches compared to us wheat flours and their starches. *Cereal Chem.*, 73, 167-175.
- Wang, T. L., Bogracheva, T. Y., and Hedley, C. L. (1998). Starch: as simple as A, B, C. *Journal of Experimental Botany*, 49, 481-502.
- Wang ZY, Zheng FQ, Shen GZ, Gao JP, Snustad DP, Li MG, Zhang JL, Hong MM (1995) The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. *The Plant Journal* 7(4): 613-622.
- Wan X.Y., J.M. Wan, C.C. Su, C.M. Wang, W.B. Shen, J.M. Li, H.L. Wang, L. Jiang, S.J. Liu, L.M. Chen, H. Yasui and A. Yoshimura (2004). QTL detection for eating quality of cooked rice in a population of chromosome segment substitution lines. *Theor. Appl. Genet.* 110: 71-79.
- Webb, B. D. (1985). Criteria of rice quality in the United States, In rice. *Chemistry and Technology*, 2nd ed., Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, M. N. 403-407.
- Wrigley, C. W.,Booth, R. I., Bason, M. L., and Walker, C. E. (1996). Rapid Visco Analyser: Progress from concept to adaptation. *Cereal Foods World* 41, 6-11.
- Wu HK, Liu SJ, Jiang L, Zhang WW, Wang YH, Ren YL, Han XH, Liu F (2009) Relationship between protein composition and total protein content and starch RVA profile properties in rice. *Chinese Journal of Rice Science* 23(4): 421-426.
- Xu, Y., L. Zhu, N. Huang and S.R. McCouch (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice(*Oryza sativa* L.) *Molecular and General Genetics* 253 : 535-545.
- Yamamoto, k., S. Sawada, and T. Onkai. (1973). Properties of rice starch prepared by alkali method with various conditions. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 20, 99-104.
- Yamanouchi H, Nakamura Y (1992) Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme(Q-Enzyme). *Plant Cell Physiol* 33(7): 985-991.
- Yang, D., L. Wu, Y. Hwang, L. Chen and N. Huang (2001). "Expression of the REB transcriptional activator in rice grains improves the yield of recombinant proteins whose genes are controlled by a Reb-responsive promoter." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20):11438.
- Yano, M., S. Fukuoka, T. Yamamoto, K. Ebana (2009) *Advances in the integration of genomics into*

- rice breeding. In Proceeding of 6th International Rice Genetics Symposium, Nov. 16-18, 2009, Manila, Philippines, pp. 18.
- Yanse, H., Ohtsubo, K., Hashimoto, K., Sato, H., and Teranishi, T. (1984). Correlation between protein contents of brown rice and textural parameters of cooked rice and cooking quality of rice. Report of National Food Research Institute, 45, 118-122.
- Yasumatsu, K., Moritara, S. and Kakinuma, T. (1964). Effect of change during storage in lipid composition of rice on its amylogram, *Agric. Biol. Chem.*, 28, 265.
- Yasurnastu, K., Moritaka, S. and Karimura, T. (1964). Fatty acid composition of rice lipid and the changes during storage. *Agri Biol, Chem.*, 28, 257-262.
- Yifang, T. and Harold, C. (2002). Factor analysis of physicochemical properties of 63 rice varieties. *J. Sci. Food Agric.* 82, 745-752.
- Yoon MR (2009) Properties of starch-lipid and lipid components in rice endosperm affected on eating quality. PhD dissertation. Kyungpook National University, Korea, pp. 1-171.
- Yoon, M. R., H. J. Koh, and M. Y. Kang. (2008). Variation of properties of lipid components in rice endosperm affected on palatability. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51, 207-211.
- Yuan, R. C., Thompson, D. B. and Boyer, C. D. (1993). Fine structure of amylopectin in relation to gelatinization and retrogradation behavior of maize starches from three wx-containing genotypes in two inbreed lines. *Cereal Chem.* 70, 81-89.
- Zhai, C. K., Lu, C. M., Zhang, X. Q., Sun, G. J. and Lorenz, K. J. (2001). Comparative study on nutritional value of Chinese and North American wild rice. *Journal of Food Composition and Analysis.* 14, 371 - 382.
- Zhang, Q., Abe, T., Ando, H. and Sasahara, T. (1996). Variations in vitro starch digestion of glutinous rice flour. *Agric Food Chem.*, 44, 2672-2674.
- Zhao BH, Zhang WJ, Wang ZQ, Zhu QS, Yang JC (2005) Changes in activities of the key enzymes related to starch synthesis in rice grain during grain filling and their relationships with the filling rate and cooking quality. *Agricultural Sciences in China* 4(1): 26-33.
- Zhou, Z., K. Robards, S. Helliwell and C. Blanchard. (2002). Composition and functional properties of rice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 849-868.
- Zhou, Z. Robards, K. Helliwell, S. and Blanchard, C. (2002). Ageing of stored rice: Changes in chemical and physical attributes. *J Cereal Sci*, 35, 65-78.
- Zobel, H. F., S. N. Young, and L. A. Rocca. (1988). Starch gelatinization an X-ray diffraction study. *Cereal Chem.* 65, 443-446.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

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.

[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm * 세로297mm)
2. 제본 : 좌철
3. 용 지
 - 가. 표지 200g/m² 양면 아트지
 - 나. 내용 80g/m² 모조지
4. 인쇄방법
 - 가. 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
 - 나. 내용 : 흑색 지정활자
 - 다. 양면인쇄

II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 보고서 요약서
4. 요약문
5. 영문 요약서(Summary)
6. 영문 목차(Contents)
7. 목 차
8. 본 문
9. 뒷면지

III. 참고사항

전자조판 인쇄시에는 이에 준한다.