

PLANT&FOREST

# Comparative nutritional analysis for protopanaxadiol-enhanced genetically modified rice and its non-transgenic counterpart

Na Yeon Kim<sup>1,†</sup>, Sung Dug Oh<sup>1,†</sup>, Soo Yun Park<sup>2</sup>, An Cheol Chang<sup>1</sup>, Seong Kon Lee<sup>1</sup>,  
Ye Jin Jang<sup>1</sup>, So-Hyeon Baek<sup>3</sup>, Yong Eui Choi<sup>4</sup>, Jong-Chan Park<sup>1</sup>, Doh Won Yun<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Jeonju 54874, Korea

<sup>2</sup>Technology Cooperation Bureau, Rural Development Administration, Jeonju 54875, Korea

<sup>3</sup>Department of Agricultural Life Science, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

<sup>4</sup>Department of Department of Forest Resources, College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

<sup>†</sup>These authors equally contributed to this study as first author.

\*Corresponding author: [dwyun@korea.kr](mailto:dwyun@korea.kr)

## Abstract

In the assessment of the biosafety of genetically modified (GM) crops, a comparative approach to identifying similarities and differences between transgenic and non-transgenic crops is helpful in identifying potential safety and nutritional issues. In this study, we aimed to compare the nutritional composition of a protopanaxadiol-enhanced genetically modified rice (PPD GM rice) with its non-transgenic counterpart. The nutritional profile of PPD GM rice was assessed against that of the parental rice cultivar 'Dongjin' to ascertain nutritional equivalence. No differences were observed between PPD GM and Non-GM rice cultivar in proximate analysis, mineral content, and amino acid composition. Although significant differences were observed in crude fat, crude protein, total dietary fiber, and some minerals between PPD GM rice and Dongjin, these variances fell within the range suggested by common cultivars (Anmi and Nipponbare) and Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) data. Similarly, while some amino acids showed significant differences, these metabolites did not deviate from the OECD range. Principal component analysis (PCA) was conducted using the nutritional analysis data of PPD GM rice and Dongjin. The results revealed that PPD GM rice and Dongjin were grouped according to their respective cultivation years. This suggests that the variability in the nutritional composition of PPD GM rice tends to resemble that of the parental rice cultivar 'Dongjin' rather than being solely attributed to genetic modification. Overall, our findings indicate that the nutritional composition of PPD GM rice is substantially equivalent to that of its non-transgenic counterpart.

**Keywords:** genetically modified (GM), nutrient composition, protopanaxadiol, transgenic rice

## OPEN ACCESS

**Citation:** Kim NY, Oh SD, Park SY, Chang AC, Lee SK, Jang YJ, Baek SH, Choi YE, Park JC, Yun DW. 2024. Comparative nutritional analysis for protopanaxadiol-enhanced genetically modified rice and its non-transgenic counterpart. Korean Journal of Agricultural Science 51:239-249. <https://doi.org/10.7744/kjoas.510214>

**Received:** April 08, 2024

**Revised:** May 17, 2024

**Accepted:** May 22, 2024

**Copyright:** © 2024 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Introduction

인삼(*Panax ginseng* Meyer)은 수천년 동안 대중적인 한약재로 사용되었으며, *Panax* 종의 주요 활성화합물인 진세노사이드는 150종 이상의 천연 진세노사이드가 분리 및 동정 되었다(Kim et al., 2017; Han et al., 2019; Mohanan et al., 2023). Protopanaxadiol (PPD)은 2,3-Oxidosqualene이 dammarenediol-II (PgDDS) 합성효소에 의해 tetracyclic triterpene (dammarenediol-II)로 전환된 후, dammarenediol-II triterpene이 protopanaxadiol 생성효소 유전자인 CYP 716A47에 의해 산화되어 생성된다(Han et al., 2019). PPD는 항비만(Kim et al., 2009), 항염(Park et al., 2009) 등 다양한 활성이 보고 되어있으며, 이미 PPD 생성 유전자가 도입된 담배(Chun et al., 2015)와 벼(Han et al., 2019) 등의 유전자변형 작물(genetically modified crops, GM 작물)이 개발되고 있다.

GM 작물은 현대 농업에서 점점 더 중요해지고 있다. 1996년 최초의 GM 작물이 상용화된 이후 전 세계 GM 작물 재배 면적은 1996년에 170만 헥타르에서 2019년에는 29개국에서 1억 9,040만 헥타르로 약 112배 이상 증가하였다 (ISAAA, 2019). GM 작물은 생물학적/비생물학적 스트레스에 대한 저항성/내성 또는 영양성분의 강화 또는 도입된 새로운 영양성분의 생산으로 작물의 최종 생산물을 개선하는 기회를 제공한다(Conner and Jacobs, 2000; Ren et al., 2009).

그러나 GM 작물에 도입된 외인성 DNA서열은 다른 유전자 또는 생화학적 경로의 조절에 영향을 줄 수 있으며, 새로운 알레르겐 또는 독소의 형태로 의도적이거나 또는 의도하지 않은 독성이나 유해한 부작용을 일으킬 우려가 존재한다. 따라서 이러한 우려를 해결하기 위해 GM 작물에 대한 안전성을 평가할 필요가 있다(Choi et al., 2012). 특히 전 세계적으로 주식 작물인 벼에 대한 안전성 문제는 생산자와 소비자뿐만 아니라 보건 당국에 의해 꾸준히 제기되어 왔다(Herman et al., 2009). 2016년 경제협력개발기구(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)에서 발행한 새로 개발된 식품 및 사료의 안전성에 관한 간행물에서 GM 작물과 non-GM 작물의 유사 점 및 차이점을 확인하기 위한 비교 접근법은 잠재적인 안전성 및 영양 문제를 식별하는 데 도움이 되며, GM 식품의 안전 및 영양성분 평가에 가장 적합한 전략이라고 언급하였다(OECD, 2016).

이를 바탕으로 GM벼와 non-GM벼의 주요 영양성분 등을 비교분석하여 안전성 평가를 하는 연구들이 보고되고 있다. Woo 등(2014)의 연구 결과에 따르면 국내 개발된 토코페롤 합성 관련 효소 tocopherol cyclase를 암호화하는 유전자가 도입된 GM벼 및 모본인 흑남벼 및 일반벼 품종 현미의 일반 성분, 무기질 및 아미노산 함량을 분석한 결과 GM벼 및 non-GM벼 간의 비의도적 영양성분 변화는 없다고 보고하였다. Lee와 Cho (2018)의 보고에 따르면 고추 유래 유전자를 도입하여 형질전환된 가뭄저항성벼와 모품종의 주요 영양성분 및 항영양소를 분석하여 비교한 결과 실질적 동등성을 확인할 수 있음을 나타냈다. 또한 Lee 등(2015)의 연구 결과에 따르면 제초제 저항성 Ab벼와 해충저항성 Bt벼 및 모본인 동진벼의 일반성분, 아미노산, 무기물, 지방산, 비타민 및 항영양소를 분석한 결과 일부 결과에서 유의적인 차이를 보였으나, 이 차이는 모본인 동진벼 및 OECD 표준기술서 범위 내에 존재하여 영양학 측면에서 실질적인 차이가 없는 것으로 판단하였다.

본 연구에서는 Han 등(2019)이 개발한 protopanaxadiol (PPD) 강화 GM벼를 이용하여 GM 작물의 식품안전성 평가를 수행하였다. PPD 강화 GM벼와 모본인 동진벼 현미의 주요 영양성분을 비교 분석하고 OECD에서 제시한 범위 및 일반 재배 품종인 안미 및 니폰바레(Sim et al., 2023)의 분석 결과를 참고하여 두 개 벼 품종 간의 주요 영양성분 조성에 차이를 비교 분석하였다.

## Materials and Methods

### 실험 재료

PPD 강화 GM벼는 인삼 유래 dammarenediol-II 합성 유전자와 protopanaxadiol 합성 유전자가 공동으로 발현되며(Han et al., 2019) 모품종인 동진벼를 국립농업과학원 전주 LMO (living modified organisms) 격리 재배 포장 (RDA-가AB-2013-041)에서 재배하였다. 2021년 및 2022년에 재배하였으며, 재배된 PPD 강화 GM벼는 각각 T5, T6 세대이다. 정식 밀도는  $30 \times 15$  cm이었으며 재배 방법은 농촌진흥청 표준재배법에(RDA, 2012) 준하였다. 시험 재료인 PPD 강화 GM벼, 동진벼와 일반 재배 품종인 안미벼 및 니폰바레를 2021년 5월 6일 파종 후 2021년 6월 4일에 포장에 이양하였으며, 2022년에는 GM벼 및 동진벼를 4월 25일 파종 후 2022년 5월 24일에 이양하였다. 이양은 3반복으로 무작위 배치하여 이루어졌으며 각 반복 별 재배 면적은  $4 \text{ m} \times 5 \text{ m}$ 이었다. 2021년 10월 27일, 2022년 10월 25일에 구획 내 벼를 무작위로 수확한 후 2주간 건조시켰다. 건조된 벼는 인습기(Rice Husker TR-130, Kett Electric Laboratory Co., Ltd., Japan)를 사용해 왕겨를 분리하고 현미로 제조하였다. 분석은 품종당 3반복으로 수행하였다.

### 일반 성분 함량 분석

시료에 함유된 수분 함량은  $105^\circ\text{C}$ 의 상압가열건조법으로 분석하였고, 회분은  $600^\circ\text{C}$ 의 직접회화법으로 분석하였다(AOAC, 2005a). 조지방은 Soxhlet 추출기(Soxtec System HT 1043 extraction unit, Foss Tecator, Eden Prairei, USA)를 사용하여 Diethyl ether로 추출하였다(AOAC, 2000a). 조단백질은 Semimicro-Kjeldahl법으로 분석하였고(AOAC, 2005b), 조섬유의 함량은 1.25% sulfuric acid와 1.25% sodium hydroxide 용액을 이용하여 Henneberg-Stohmann 분석법으로 측정하였다(MFDS, 2019a). 총 식이섬유의 함량은 효소 중량법에 따라 분석하였다(MFDS, 2019b). 탄수화물 함량은 다음 계산식을 사용하여 정량하였다.

$$\text{탄수화물}(\%) = 100 - (\text{수분}\% + \text{조단백질}\% + \text{조지방}\% + \text{조회분}\%) \quad (1)$$

### 아미노산 함량 분석

벼 시료 일정량을 유성형 불밀(Pulverisette 6, Fritsch, Germany)로 분쇄한 후 6N hydrogen chloride (HCl) 용액을 처리하였고, 질소가스를 주입하여  $110^\circ\text{C}$ 에서 24시간 가수분해하였다. 이후에 HCl을 증발시켜 제거한 후 증류수로 반복 세척하여 감압 농축하였다. 감압 농축된 시료를 Sodium citrate buffer (pH 2.2)로 용해하여 아미노산 자동분석기(Amino acid analyser L-8500A, Hitachi, Japan)를 사용하여 분석하였다(AOAC, 2005c).

### 무기질 함량 분석

일정량의 시료에 질산 5 mL을 넣은 후 회화 될 때까지 가열하였다. 이후 질산 용액 10 mL과 70% 과염소산 10 mL을 첨가하여  $450^\circ\text{C}$ 까지 재가열하였다. 고형물이 완전히 분해 될 때까지 가열한 후 즉시 냉각하여 소량의 물로 희석하였다. 용액을 증발 및 건조시킨 후 남은 시료를 0.1 M 질산 용액에 용해하여 분석에 이용하였다. 칼슘, 철, 칼륨, 마그네슘, 나트륨, 인, 아연의 함량을 ICP-OES (Integra XL Inductively coupled plasma optical emission spectrometer, GBC Co., Australia)로 분석하였다(AOAC, 2000b).

## Protopanaxadiol 함량 분석

분쇄된 현미 시료 100 mg에 100% methanol을 첨가한 후 40°C에서 30분 동안 초음파 처리를 하였다. 원심분리 후 얻어진 상층액은 주입 전 수집하였다. 추출물은 Shimadzu LC system (Japan)을 이용하여 분석하였으며, 컬럼은 YMC-Pack Pro C18 RS (150 × 2.0 mm. D, S-5 μm, 8 nm, YMC Co., Ltd., Japan)를 사용하였다. 컬럼 온도는 40°C로 설정하였다. Liquid chromatograph-mass spectrometry ion trap/time-of-flight (LCMS-IT-TOF) (Shimadzu, Japan)은 positive and/or negative ion mode에서 atmospheric pressure chemical ionization (APCI) 소스를 장착하였다. 표준 protopanaxadiol은 위와 같은 조건에서 수행하였으며, LC 및 LCMS-IT-TOF 분석의 자세한 프로토콜은 Han 등 (2019)에서 사용한 방법과 동일하다.

## 통계처리

본 연구에 성분분석 결과는 3반복을 수행하였으며 결과에 대한 통계 분석은 SPSS (23.0.0 for Windows, Rel.23.0, 2015. SPSS Inc., USA)를 이용하여 평균값에 대해  $p < 0.05$  수준에서 유의성 여부(ANOVA, Duncan 다중범위 검정)을 확인하였다. 또한, SIMCA-P version 12.0 (Umetrics, Swaden)을 이용하여 다변량 분석 중 주성분 분석(principal component analysis, PCA)를 수행하였다. 모든 변수는 단위 분산 방식으로 표준화 하였으며, 분석 결과는 score plot 및 loading plot으로 나타내었다.

## Results and Discussion

### 일반 성분 함량 분석

2021년 및 2022년에 재배한 protopanaxadiol (PPD) 강화 GM벼와 모품종인 동진벼(non-GM벼)의 일반영양성분 분석 결과는 Table 1과 같다. PPD 강화 GM벼의 영양성분별 값의 범위는 일반 재배 품종인 안미 및 니폰바레벼(Sim et al., 2023)와 OECD 기준자료(OECD, 2016)와 비교하였다. OECD 기준자료와 비교는 일반 재배 품종의 자연 변이

**Table 1.** Analysis of the proximate compositions measured in non-GM rice and GM rice.

Varieties	Years	Component (g/100 g DW)						
		Moisture	Crude ash	Crude protein	Crude fat	TDF	Crude fiber (% DW)	Carbohydrates
Dongjin	2021	9.09 ± 0.04a <sup>z</sup>	1.20 ± 0.06b	5.85 ± 0.02c	2.03 ± 0.05b	2.00 ± 0.01b	0.54 ± 0.08a	81.82 ± 0.09b
	2022	6.76 ± 0.39b	1.32 ± 0.02a	6.55 ± 0.06b	2.25 ± 0.02a	1.89 ± 0.11b	0.63 ± 0.04a	83.12 ± 0.34a
Protopanaxadiol-enhanced GM rice	2021	9.17 ± 0.10a	1.23 ± 0.01b	5.82 ± 0.04c	1.83 ± 0.06c	2.05 ± 0.05b	0.56 ± 0.04a	81.93 ± 0.02b
	2022	6.70 ± 0.08b	1.34 ± 0.01a	6.81 ± 0.04a	2.00 ± 0.06b	2.35 ± 0.25a	0.68 ± 0.11a	83.15 ± 0.04a
Commercial <sup>y</sup>		9.44 - 12.66	1.09 - 1.37	5.71 - 7.53	1.95 - 2.63	1.73 - 3.94	0.65 - 0.92	78.32 - 80.80
OECD range		11.37 - 16.40	1.00 - 1.50	7.10 - 8.30	1.60 - 2.80	3.5	0.60 - 1.00	72.90 - 75.90
Variety		NS	NS	**	***	*	NS	NS
year		***	***	***	***	NS	*	***
Variety × year		NS	NS	**	NS	*	NS	NS

Values indicate the mean ± standard deviation (SD) measures (n = 3).

GM, genetically modified; TDF, total dietary fiber; DW, dry weight; NS, not significant.

<sup>y</sup> Non-transgenic rice (Anmi and Nipponbare) by Sim et al. (2023).

<sup>z</sup> a - c: Values followed by the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$ .

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

수준이 자연 허용 오차 범위 내임을 보장할 수 있다(Sim et al., 2023). 모든 성분 분석 결과는 건조 중으로 나타내었다. 벼 종자를 수확한 후 건조하였을 때 수분 함량은 2021년도에 수확한 GM벼가 9.11 - 9.29%, 동진벼가 9.06 - 9.13%를 보였으며, 2022년도에 수확한 PPD 강화 GM벼는 6.60 - 6.76%, 동진벼가 6.32 - 7.05%를 보였다. 조회분, 조단백질 및 탄수화물의 함량은 2022년에 재배한 GM벼 및 동진벼가 2021년에 재배한 두 품종보다 더 높았지만 조회분 및 탄수화물은 품종 간의 유의한 차이는 보이지 않았고 조단백질의 경우 품종 간 유의한 차이를 보였다. 하지만 조회분 및 조단백질의 함량은 모두 일반 재배 품종(Sim et al., 2023) 및 OECD (2016)에 제시된 함량 범위(Table S1) 내에 포함되었다. 2021년에 재배된 GM벼와 동진벼의 조섬유의 함량은 문헌에 제시된 기준 자료의 범위보다 약간 낮았다. 2021년 및 2022년에 재배된 GM벼와 동진벼의 탄수화물 함량은 두 품종 모두 높게 나타났지만 품종 간의 통계적인 유의 차는 없었으며, Lee 등(2015)이 분석한 non-GM벼인 동진벼 및 GM벼인 제초제 저항성 Ab벼와 해충저항성 Bt벼의 결과는 각각  $91.61 \pm 0.21$ ,  $91.44 \pm 0.23$ ,  $91.65 \pm 0.38\%$ 으로 우리의 분석 결과와 같은 경향을 보였다. 이를 통해 PPD 강화 GM벼 및 동진벼 영양학적 차이가 없을 것으로 사료된다.

## 무기질 함량 분석

2021년 및 2022년에 재배한 GM벼와 동진벼의 무기질 함량 분석 결과는 Table 2에 나타났다. GM벼와 동진벼의 무기질 함량은 인, 칼륨 및 마그네슘 순으로 높게 확인되었으며, 이는 이전에 보고된 연구 결과(Woo et al., 2014)와 유사하였다. GM벼와 동진벼의 마그네슘, 인, 칼륨 및 아연의 함량은 2021년에 비해 2022년에 재배된 경우 비교적 높은 함량을 보였지만 품종 간 유의 차는 보이지 않았다. 아연, 망간 및 나트륨의 함량은 2022년에 재배된 GM벼에서 높게 나타났다. 하지만, 위의 3종의 미네랄 함량은 Sim 등(2023)과 OECD (2016)가 제시한 범위 내에 포함되었고, 특히 나트륨의 경우 Lee와 Cho (2018)가 보고한 GM벼인 가뭄저항성벼(Agb0103)가 모본인 일미벼 보다 나트륨의 함량이 유의적으로 높게 나타난 결과와 유사하였다. 벼의 무기질 함량은 환경 요인에 영향을 받으며(Huang et al., 2016), Du 등(2013)은 기후는 작물의 무기질 축적에 영향을 미치는 주요 요소이며, 식물의 성장 및 대사를 변화시켜 토양 내 무기질 흡수에 영향을 줄 수 있다고 보고하였다. 벼의 생육 시기인 6 - 9월 전주의 기상 상황을 보면, 2021년도 6 - 9월의 평균 최저 기온은 12.9 - 20.4°C이며, 평균 최고 기온은 30.5 - 44.3°C이었다. 2022년도 6 - 9월의 평균 최저 기온은 10.3 - 20.7°C이며, 평균 최고 기온은 32.9 - 36.1°C이었다. 특히, 2021년 및 2022년도 8월의 최고 기

**Table 2.** Analysis of the mineral levels measured in non-GM rice and GM rice.

Varieties	Years	Component (mg/100 g DW)							
		Calcium (Ca)	Magnesium (Mg)	Phosphorus (P)	Potassium (K)	Iron (Fe)	Manganese (Mn)	Sodium (Na)	Zinc (Zn)
Dongjin	2021	9.16 ± 0.27b <sup>z</sup>	91.49 ± 1.53c	291.85 ± 3.71b	199.85 ± 1.56c	1.01 ± 0.07b	1.68 ± 0.01c	8.60 ± 0.63c	1.63 ± 0.08b
	2022	19.95 ± 10.39a	105.33 ± 3.48a	369.53 ± 51.36a	276.47 ± 27.39a	0.93 ± 0.14b	2.08 ± 0.04b	5.62 ± 0.34d	1.97 ± 0.33a
Protopanaxadiol-enhanced GM rice	2021	10.22 ± 0.16ab	95.85 ± 1.21b	307.21 ± 1.33b	211.73 ± 4.08c	1.14 ± 0.13b	1.73 ± 0.03c	11.97 ± 0.44b	1.61 ± 0.04b
	2022	11.58 ± 0.13ab	104.31 ± 0.39a	338.09 ± 4.77ab	242.31 ± 1.98b	1.55 ± 0.24a	2.21 ± 0.05a	13.50 ± 1.34a	1.73 ± 0.01ab
Commercial <sup>y</sup>		14.26 - 16.26	103.02 - 132.32	378.56 - 500.05	242.54 - 337.91	0.60 - 1.93	1.57 - 3.73	7.07 - 19.13	1.75 - 2.58
OECD range		10.00 - 60.00	20.00 - 170.00	200.00 - 500.00	70.00 - 320.00	0.20 - 6.00	0.20 - 4.20	2.00 - 40.00	0.70 - 3.30
Variety		NS	NS	NS	NS	**	**	***	NS
year		NS	***	**	***	NS	***	NS	*
Variety × year		NS	*	NS	*	*	NS	**	NS

Values indicate the mean ± standard deviation (SD) measures (n = 3).

DW, dry weight; GM, genetically modified; NS, not significant.

<sup>z</sup> Non-transgenic rice (Anmi and Nipponbare) by Sim et al. (2023).

<sup>y</sup> a - d: Values followed by the same letters are not significantly different at p < 0.05.

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

온은 각각 44.3, 34.9°C로 약 10°C 차이를 보였다(Table S2). 작물의 생육에 영향을 미치는 환경적 요인 중 하나인 온도로 인해 벼 종자의 무기질 함량 변이를 확인하기 위해서는 추후 연구를 통해 상관관계 분석이 필요할 것으로 사료된다.

### 아미노산 함량 분석

2021년 및 2022년도에 재배한 GM벼와 동진벼에서 18종의 아미노산을 분석한 결과는 Table 3와 같다. 아미노산 함량 분석 결과 2021년에 재배한 GM벼와 동진벼보다 2022년에 재배한 두 품종의 모든 아미노산 함량이 높게 나타났다. 2021년에 재배한 GM벼와 동진벼의 glutamic acid 함량은 각각 0.81, 0.84%였으며 2022년에 재배한 GM벼와 동진벼는 각각 1.01, 1.02%로 18종 아미노산 중 가장 높았으며, 그 다음으로 aspartic acid가 높게 검출되어 주로 산성 아미노산의 함량이 높게 측정되었다. 2021년 및 2022년에 재배한 두 품종 모두 arginine, leucine, valine 순으로 높은 함량을 보였으며 histidine, methionine, tryptophan 순으로 낮은 함량을 보였다. Kim 등(2017)은 레스베라스톨 강화벼 및 모본인 동진벼의 아미노산 함량은 glutamic acid, aspartic acid, arginine, leucine 순으로 높게 나타났다고 보고하였고, Woo 등(2014)의 결과에 따르면 일반 품종(일미 및 동진) 및 GM벼(RTB5, RTB11)의 아미노산 중 histidine, methionine, cysteine 함량은 낮았는데 이 결과는 PPD 강화 GM벼와 동진벼의 아미노산 분석 결과와 유사하였다. 2022년에 재배한 GM벼와 동진벼의 18종 아미노산 함량은 2021년에 재배한 두 품종보다 모두 높은 함량을 보였으며, 일반 재배 품종(Sim et al., 2023) 및 OECD (2016)가 제시한 범위 안에 속하였다. 결과적으로, GM벼 및 동진벼의 아미노산 함량은 유의적인 차이는 없는 것으로 판단된다.

**Table 3.** Analysis of the amino acid levels measured in non-GM rice and GM rice.

Component (% DW)	Varieties				Commercial <sup>1)</sup>	OECD range	Variety	Year	Variety × year
	Dongjin		Protopanaxadiol-enhanced GM rice						
	2021	2022	2021	2022					
Alanine	0.298 ± 0.010b <sup>2</sup>	0.358 ± 0.004a	0.292 ± 0.019b	0.355 ± 0.008a	0.22 - 0.36	0.37 - 0.59	NS	***	*
Arginine	0.423 ± 0.019b	0.508 ± 0.002a	0.412 ± 0.029b	0.508 ± 0.005a	0.30 - 0.53	0.52 - 0.88	NS	***	NS
Aspartic acid	0.465 ± 0.017b	0.557 ± 0.005a	0.454 ± 0.029b	0.555 ± 0.014a	0.35 - 0.58	0.59 - 0.96	NS	***	*
Cysteine	0.191 ± 0.006c	0.221 ± 0.002b	0.200 ± 0.002c	0.223 ± 0.008a	0.15 - 0.22	0.15 - 0.28	NS	***	NS
Glutamic acid	0.841 ± 0.023b	1.020 ± 0.014a	0.813 ± 0.041b	1.014 ± 0.033a	0.64 - 1.11	1.06 - 1.88	NS	***	NS
Glycine	0.243 ± 0.010b	0.289 ± 0.002a	0.238 ± 0.017b	0.288 ± 0.005a	0.19 - 0.30	0.32 - 0.48	NS	***	*
Histidine	0.129 ± 0.008b	0.154 ± 0.004a	0.123 ± 0.007b	0.150 ± 0.008a	0.10 - 0.15	0.16 - 0.27	NS	***	NS
Isoleucine	0.205 ± 0.006b	0.249 ± 0.005a	0.198 ± 0.010b	0.245 ± 0.005a	0.14 - 0.24	0.22 - 0.40	NS	***	*
Leucine	0.397 ± 0.012b	0.484 ± 0.004a	0.383 ± 0.022b	0.478 ± 0.015a	0.29 - 0.51	0.51 - 0.85	NS	***	NS
Lysine	0.206 ± 0.009b	0.248 ± 0.012a	0.201 ± 0.015b	0.240 ± 0.004a	0.15 - 0.25	0.26 - 0.40	NS	***	NS
Methionine	0.120 ± 0.001b	0.131 ± 0.006a	0.119 ± 0.005b	0.138 ± 0.003a	0.10 - 0.15	0.14 - 0.34	NS	**	NS
Phenylalanine	0.266 ± 0.005b	0.331 ± 0.020a	0.255 ± 0.008b	0.316 ± 0.008a	0.19 - 0.33	0.32 - 0.55	NS	***	NS
Proline	0.243 ± 0.011b	0.296 ± 0.008a	0.244 ± 0.015b	0.293 ± 0.006a	0.17 - 0.28	0.25 - 0.46	NS	***	**
Serine	0.250 ± 0.007b	0.289 ± 0.003a	0.238 ± 0.010b	0.287 ± 0.015a	0.18 - 0.33	0.30 - 0.53	NS	***	NS
Threonine	0.187 ± 0.006b	0.222 ± 0.003a	0.181 ± 0.011b	0.221 ± 0.008a	0.14 - 0.23	0.23 - 0.38	NS	***	NS
Tryptophan	0.048 ± 0.002b	0.072 ± 0.007a	0.053 ± 0.012b	0.071 ± 0.005a	0.05 - 0.06	0.05 - 0.13	NS	***	NS
Tyrosine	0.233 ± 0.007b	0.285 ± 0.007a	0.225 ± 0.011b	0.276 ± 0.002a	0.14 - 0.25	0.21 - 0.51	NS	***	NS
Valine	0.302 ± 0.009b	0.375 ± 0.005a	0.293 ± 0.011b	0.365 ± 0.011a	0.22 - 0.37	0.37 - 0.59	NS	***	*

Values indicate the mean ± standard deviation (SD) measures (n = 3).

GM, genetically modified; NS, not significant.

<sup>1)</sup> Non-transgenic rice (Anmi and Nipponbare) by Sim et al. (2023).

<sup>2)</sup> a - c: Values followed by the same letters are not significantly different at p < 0.05.

\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

## Protopanaxadiol 함량 분석

2021년 및 2022년도에 재배한 PPD 강화 GM벼의 PPD 함량 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. 모품종인 동진벼의 경우 protopanaxadiol (PPD)는 검출되지 않았으며, 2021년에 재배한 PPD 강화 GM벼의 PPD 함량은 7.12 - 8.18  $\mu\text{g/g DW}$ , 2022년에 재배한 PPD 강화 GM벼는 12.47 - 19.42  $\mu\text{g/g DW}$ 로 분석되었으며, 2021년보다 2022년에 재배한 GM벼의 PPD 함량이 약 1.75 - 2.37배 증가한 것으로 분석되었다.

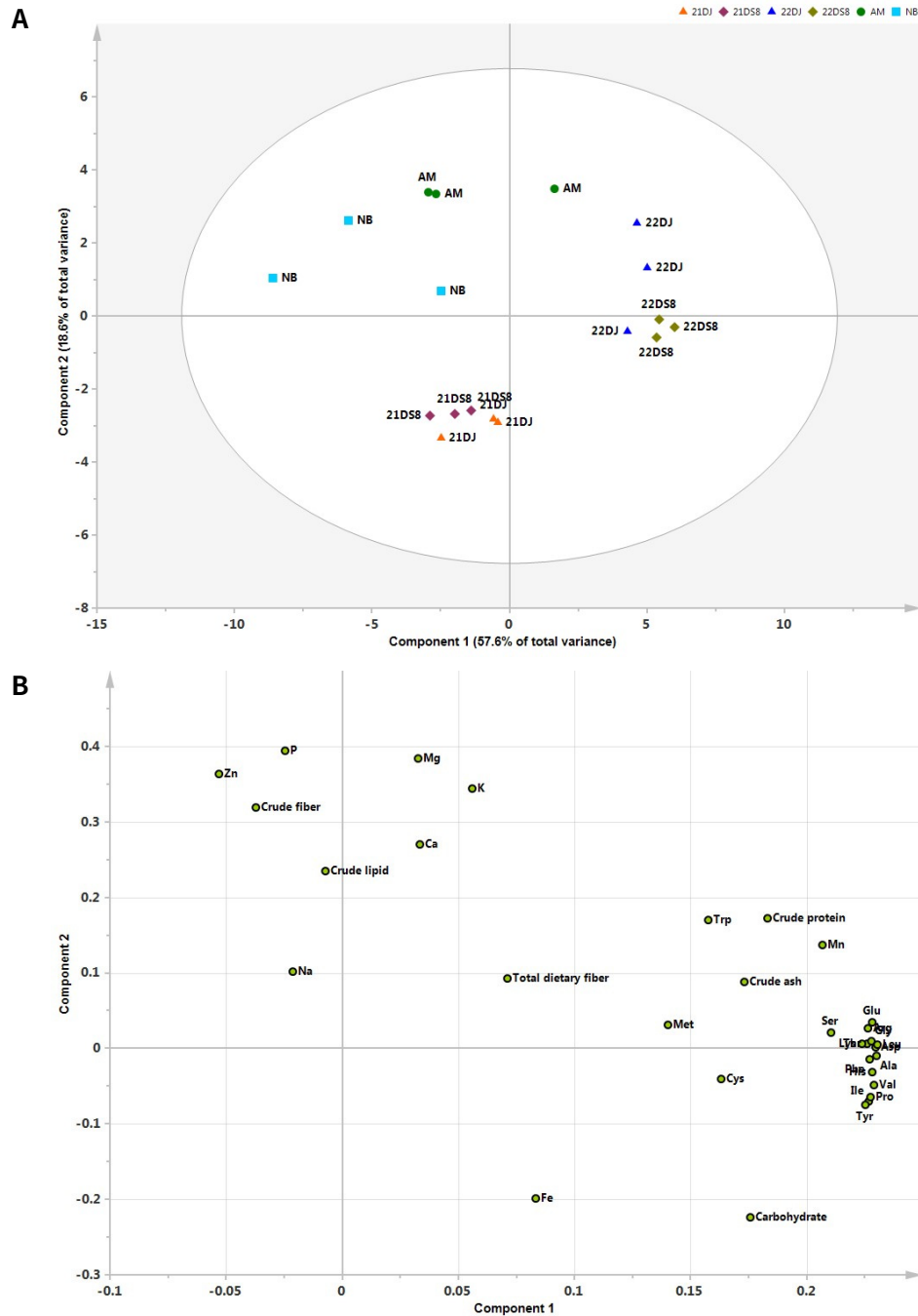
**Table 4.** Protopanaxadiol concentration in non-GM rice and GM rice.

Variety	2021		2022	
	Dongjin	Protopanaxadiol-enhanced GM rice	Dongjin	Protopanaxadiol-enhanced GM rice
Protopanaxadiol content ( $\mu\text{g/g DW}$ )	ND	7.65 $\pm$ 0.53	ND	14.96 $\pm$ 3.87

Values indicate the mean  $\pm$  standard deviation (SD) measures ( $n = 3$ ). GM, genetically modified; DW, dry weight; ND, not determined.

## 일반영양성분 함량 PCA 분석

PPD 강화 GM벼와 동진벼의 주요 영양성분 함량 분석 데이터를 이용하여 주성분분석을 수행하였다. PPD 강화 GM벼의 영양성분 함량의 변이성을 보다 다양한 Non-GM벼와 비교분석을 하기 위하여 모본인 동진벼 이외에 안미 (Anmi)와 니폰바레(Nipponbare)의 영양성분 분석 결과(Sim et al., 2023)를 추가하여 주성분분석을 수행하였다 (Fig. 1). 벼 유전형질 4종(PPD 강화 GM벼, 동진벼, 안미, 니폰바레)에 대한 일반 성분 및 무기질, 아미노산 등 총 32개 성분 함량의 변이성을 분석한 결과, 동진벼와 PPD 강화 GM벼의 경우 재배 연도에 따라 주요 영양성분 함량의 변이성이 유전형질보다 더 크게 나타났다. 즉, score plot (Fig. 1A)에서 동진벼와 PPD 강화 GM벼가 재배 연도에 따라 각각 그룹화가 되었다. 또한, 2022년에 재배한 벼의 경우 PPD 강화 GM벼보다 동진벼의 영양성분 함량 변이가 더 큼을 알 수 있었다. 안미와 니폰바레의 영양성분 변이성과 비교해보면, 오히려 PPD 강화 GM벼의 영양성분의 변이성이 작았다. 상위 2개의 주성분에 대한 분석 결과가 총 변이의 76.2%를 포함하고 있어, PPD 강화 GM벼의 영양성분 함량의 변이성이 Non-GM 보다 작음을 보다 신뢰성 있게 증명하고 있다. 재배 연도 및 유전형질에 따라 나타나는 이러한 영양성분 함량의 변이성을 영양성분별로 보다 자세히 살펴보기 위하여 loading plot을 분석하였다(Fig. 1B). Loading plot을 통해 영양성분의 분포를 살펴본 결과, 동진벼와 PPD 강화 GM벼는 안미와 니폰바레에 비교해 cysteine, serine 등 아미노산의 함량이 높은 반면, 인, 마그네슘, 아연 등 무기질의 함량은 낮음을 알 수 있었다. 일반 성분의 경우, 조지방과 조섬유의 함량이 안미와 니폰바레에서 비교적 높은 반면에 조단백질과 탄수화물의 함량은 동진벼와 PPD 강화 GM벼에서 높음을 알 수 있었다. 즉, 아미노산과 조단백질, 탄수화물의 함량이 동진벼와 PPD 강화 GM벼에서 높게 나타난 것이다. 동진벼와 PPD 강화 GM벼가 재배 연도에 따라 그룹화가 되는데 영향을 미친 성분은 철분과 조단백질이었으며, 이 성분함량이 재배지의 토양성분이나 기후 등에 따라 영향을 비교적 크게 받는지는 다양한 재배환경에서 재배실험을 하는 등의 추가적인 검증을 통해 확인해 볼 필요가 있을 것이다. 결과적으로, 주성분분석을 통해 protopanaxadiol 함량을 높인 PPD 강화 GM벼의 32개 영양성분의 함량 변이성은 다른 유전형질과 비교해 오히려 모본과 유사한 경향을 보임을 알 수 있었다.



**Fig. 1.** Score (A) and loading (B) plots of the principal component analysis (PCA) results obtained from data on 32 nutrients collected from four different genotypes (Dongjin-byoe, Protopanaxadiol-enhanced genetically modified (GM) rice, Anmi, Nipponbare) of rice cultivated for two years (2021 and 2022). Abbreviations: 21DJ, *Oryza sativa* L. cv. Dongjin cultivated in 2021; 21DS8, protopanaxadiol-enhanced GM rice cultivated in 2021; 22DJ, *Oryza sativa* L. cv. Dongjin cultivated in 2022; 22DS8, protopanaxadiol-enhanced GM rice cultivated in 2022; AM, *Oryza sativa* L. cv. Anmi; NB, *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare; Ca, calcium; Mg, magnesium; P, phosphorus; K, potassium; Fe, iron; Mn, manganese; Na, sodium; Zn, zinc; Ala, alanine; Arg, arginine; Asp, aspartic acid; Cys, cysteine; Glu, glutamic acid; Gly, glycine; His, histidine; Iso, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine; Met, methionine; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Ser, serine; Thr, threonine; Try, tryptophan; Tyr, tyrosine; Val, valine.



## Conclusion

본 연구에서는 PPD 강화 GM벼의 식품안전성 평가에 더 많은 근거를 제공하기 위해 영양성분 분석 기반 접근법을 적용하여 형질전환 벼의 현미와 비형질전환 벼 현미의 주요 영양성분을 조사하였다. 우리의 연구결과는 2021년에 재배한 PPD 강화 GM벼(T5)와 비교하여 2022년에 재배한 GM벼(T6)에서는 1.75 - 2.37배 PPD 함량이 증가하였으며, 세대 증진 후에도 PPD를 안정적으로 생산한다는 것을 입증하였다. 일반 영양성분 분석 결과 Non-GM벼와 PPD 강화 GM벼 내 조지방, 조단백질, 총 식이섬유, 일부 무기질, 일부 아미노산 등의 함량이 유의미한 차이를 보였으나, 이러한 변이는 일반 재배 품종(안미 및 니폰바레) 및 OECD가 제시한 범위 내에 포함되었다. 따라서, 우리의 연구결과에 따른 영양성분의 동등성에 대한 차이는 도입유전자로 인한 위해 요소로 판단하기 보다는 생장 환경조건 차이와 같은 의도하지 않은 변이가 발생한 결과로 해석할 수 있다. 이 연구결과는 보다 안정적인 GM작물의 안전성 평가 모델을 구축하고 영양성분 동등성 평가 접근법에 활용할 수 있는 기초자료가 될 수 있을 것으로 기대한다.

## Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 연구개발사업(과제번호: PJ01369102, PJ016726)의 지원으로 수행되었습니다.

## References

- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2000a. Fat (crude) or ether extract in meat. AOAC official methods. 960.39. AOAC, Rockville, USA.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2000b. Determination of lead, calcium, copper, iron, zinc, sodium, magnesium, phosphorus, potassium, manganese in food. AOAC official methods 999.11. AOAC, Rockville, USA.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2005a. Ash of floure. AOAC official methods 923.03. AOAC, Rockville, USA.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2005b. Nitrogen (total) in fertilizers. AOAC official methods 955.04. AOAC, Rockville, USA.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2005c. Protein efficiency ratio. AOAC official methods 982.30. AOAC, Rockville, USA.
- Choi H, Moon JK, Park BS, Park HW, Park SY, Kim TS, Kim DH, Ryu TH, Kweon SJ, Kim JH. 2012. Comparative nutritional analysis for genetically modified rice, Iksan483 and Milyang204, and nontransgenic counterparts. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 55:19-26. [in Korean]
- Chun JH, Adhikari PB, Park SB, Han JY, Choi YE. 2015. Production of the dammarene saponin (protopanaxadiol) in transgenic tobacco plants and cultured cells by heterologous expression of PgDDS and CYP716A47. *Plant Cell Reports* 34:1551-1560.
- Conner AJ, Jacobs JME. 2000. Food risks from transgenic crops in perspective. *Nutrition* 16:709-711.
- Du J, Zeng D, Wang B, Qian Q, Zheng S, Ling HQ. 2013. Environmental effects on mineral accumulation in rice grains and identification of ecological specific QTLs. *Environmental Geochemistry and Health* 35:161-170.
- Han JY, Baek SH, Jo HJ, Yun DW, Choi YE. 2019. Genetically modified rice produces ginsenoside aglycone (protopanaxadiol). *Planta* 250:1103-1110.

- Herman RA, Chassy BM, Parrott W. 2009. Compositional assessment of transgenic crops: An idea whose time has passed? *Trends in Biotechnology* 27:555-557.
- Huang Y, Tong C, Xu F, Chen Y, Zhang C, Bao J. 2016. Variation in mineral elements in grains of 20 brown rice accessions in two environments. *Food Chemistry* 192:873-878.
- ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech applications). Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019: Biotech crops drive socioeconomic development and sustainable environment in the new frontier. ISAAA Brief No. 55. 2019. p. 8. ISAAA, Manila, Philippines.
- Kim JH, Kang SA, Han SM, Shim I. 2009. Comparison of the antiobesity effects of the protopanaxadiol- and protopanaxatriol-type saponins of red ginseng. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 23:78-85.
- Kim JH, Yi YS, Kim MY, Cho JY. 2017. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. *Journal of Ginseng Research* 41:435-443.
- Lee SY, Yeo YS, Park SY, Oh SW, Yoon EK, Shin KS, Woo HJ, Lim MH. 2015. Composition analysis of herbicide tolerant ab rice and insect-resistant BT rice. *Korean Journal of Breeding Science* 47:255-263. [in Korean]
- Lee YT, Cho Y. 2018. Nutritional assessment for grain and whole rice plant of drought-tolerant GM rice (Agb0103). *Journal of the Korean Society of International Agriculture* 30:233-240. [in Korean]
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2019a. Crude fiber (Henneberg-Stohmann method) in MFDS food code Chapter 8, 2.1.4.2. MFDS, Cheongju, Korea.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2019b. Total dietary fiber (enzyme-weight method) in MFDS food code Chapter 8, 2.1.4.3. MFDS, Cheongju, Korea.
- Mohanan P, Yang TJ, Song YH. 2023. Genes and regulatory mechanisms for ginsenoside biosynthesis. *Journal of Plant Biology* 66:87-97.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2016. Consensus document on compositional considerations for new varieties of rice (*Oryza sativa*): Key food and feed nutrients and anti-nutrients. Organization for Economic Cooperation and Development. p. 11. OECD, Paris, France.
- Park JS, Park EM, Kim DH, Jung K, Jung JS, Lee EJ, Hyun JW, Kang JL, Kim HS. 2009. Anti-inflammatory mechanism of ginseng saponins in activated microglia. *Journal of Neuroimmunology* 209:40-49.
- RDA (Rural Development Administration). 2012. Standard of analysis and survey for agricultural research. pp. 315-338. RDA, Jeonju, Korea.
- Ren Y, Lv J, Wang H, Li L, Peng Y, Qu LJ. 2009. A comparative proteomics approach to detect unintended effects in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Genetics and Genomics* 36:629-639.
- Sim JE, Oh SD, Kim YJ, Ahn SK, Choi J, Park SY, Park SK, Kim TJ, Kang K, Kim JK. 2023. Chemical profiling of insect-resistant rice shows that geographical variations produce greater differences in chemical composition than genetic modifications. *Plant Biotechnology Reports* 17:137-144.
- Woo HJ, Shin KS, Lim MH, Park SK. 2014. Comparison of the nutritional compositions of oxidative stress-tolerant transgenic rice and conventional rice. *Journal of Plant Biotechnology* 41:206-211. [in Korean]

**Table S1.** The proximate content of rice seeds from Sim et al. (2023).

Proximate compound (g/100 g, DW)	Anmi and Nipponbare (min - max)
Moisture	9.44 - 12.66
Crude protein	5.71 - 7.53
Crude fat	1.95 - 2.63
Crude ash	1.09 - 1.37
Crude fiber	0.65 - 0.92
Total dietary fiber	1.73 - 3.94
Carbohydrate	78.32 - 80.80

DW, dry weight.

**Table S2.** Environmental conditions at Jeonju region during the 2021 and 2022.

Year	Month	Temp (°C) <sup>y</sup>			Rainfall (mm) <sup>z</sup>
		Min.	Max.	Average	
2021	6	12.9	33.6	22.6	144.5
	7	20.4	35.8	27.1	224.0
	8	19.6	44.3	26.0	357.5
	9	13.6	30.5	22.8	199.0
2022	6	11.5	32.9	23.7	163.0
	7	20.7	36.1	27.1	135.0
	8	15.2	34.9	26.3	302.0
	9	10.3	34.3	22.3	80.0

Source: <http://weather.rda.go.kr/w/index.do>.

<sup>y</sup> Mean value of daily temperature.

<sup>z</sup> Total volume of rainfall during 1 month.