

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 10월 12일 (12.10.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/176084 A2

- (51) 국제특허분류:
A01H 4/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
A01G 1/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/003811
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 7일 (07.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0043000 2016년 4월 7일 (07.04.2016) KR
- (71) 출원인: 한국 한의학 연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 강영민 (KANG, Young Min); 34321 대전시 대덕구 대덕대로 1520 번길 55, 101 동 504 호, Daejeon (KR). 문병철 (MOON, Byeong-Cheol); 34006 대전시 유성구 와룡로 136 번길 15, 104 동 401 호, Daejeon (KR). 이가연 (LEE, Ka Youn); 61924 광주광역시 서구 경열로 148, Gwangju (KR). 최지은 (CHOI, Ji Eun); 39569 경상북도 김천시 대항면 대룡 1길 55-26, Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

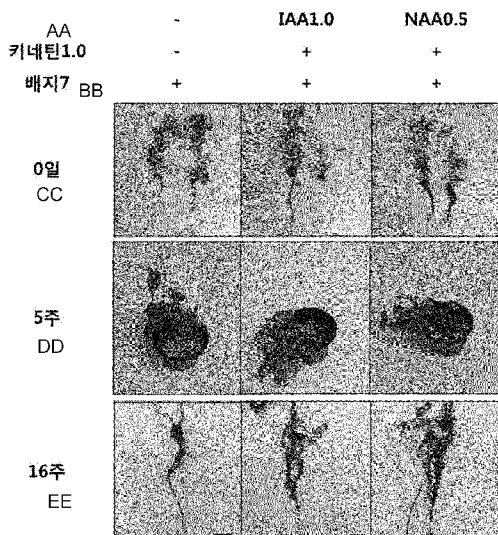
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MEDIUM COMPOSITION FOR IN VITRO CULTURING *POLYGONI MULTIFLORI RADIX* AND METHOD FOR MASS PRODUCTION OF SEEDLING USING SAME

(54) 발명의 명칭: 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를 이용하는 종묘 대량 생산방법



AA ... Kinetin 1.0
BB ... Medium 7
CC ... Day 0
DD ... Week 5
EE ... Week 16

(57) Abstract: The present invention relates to a medium composition for in vitro culturing *Polygoni Multiflora Radix* and a method for mass production of seedlings using the same. In detail, media that exhibited excellent growth rates upon in vitro culturing *Polygoni Multiflora Radix* were selected from among 10 different media, and the selected media, when supplemented with the plant growth regulator kinetin in combination with IAA or NAA, were found to allow tuberous roots of seedlings to differentiate well. Further, it was found that culturing in the media under the control of contents of inorganic salts therein led to the growth of plants having well-differentiated tuberous roots and that the plants were well-acclimated to soil.

(57) 요약서: 본 발명은 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를 이용하는 종묘 대량 생산방법에 관한 것이다. 상세하게는 10종의 배지를 사용하여 하수오 기내배양하여 생장율이 우수한 배지를 선정하고, 이를 기반으로 식물생장조절제로 키네티인과 IAA 또는 NAA를 이용하여 배양한 것이 덩이뿌리 분화가 우수하다는 것을 확인하였다. 또한 상기 배지 내의 무기염류의 함량을 조절하여 배양함으로써 덩이뿌리 분화가 우수한 배양묘를 생산하였고, 생산된 배양묘가 토양순화가 잘되는 것을 확인하였다.



공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를 이용하는 종묘 대량 생산방법

기술분야

- [1] 본 발명은 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를 이용하는 종묘 대량 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 하수오(何首烏, Polygoni Multiflori Radix)는 마디풀과에 속하는 식물 하수오의 덩이뿌리를 말한다. 하수오는 다년생 초본으로 덩굴성 식물이고, 뿌리는 방추형 또는 덩이뿌리이며, 길이는 5~15cm, 지름은 3~12cm이다. 줄기는 덩굴성이며 마디가 있고 줄기의 아랫부분은 목질로 속이 비어있으며 잎은 어긋나고 단엽이며 엽병이 길고 난형 또는 심장형이다. 잎의 가장자리는 밋밋하고 양면에 털은 없다. 꽃은 줄기 끝이나 엽맥에 큰 원추형 화서가 달리며 10월에 녹색으로 피고 꽃잎은 5개로 갈라져 있다.
- [3] 하수오의 절단 전 덩이뿌리의 길이는 6~12cm, 지름은 3~12cm이고, 외면은 적갈색에서 암갈색으로 울퉁불퉁하고 불규칙한 세로 홈이 있으며 뿌리의 흔적이 있다. 절단 약재의 단면은 연한 적갈색 또는 연한 황갈색을 띠고 몇 개의 원형에 가까운 이형 섬유관이 운금 모양의 무늬를 형성한다. 이 운금 모양의 무늬는 건조 전인 괴경이나 건조 후의 약재에서도 잘 나타나는 특징의 하나로 하수오를 형태적으로 구별할 수 있는 감별 포인트로 잘 알려져 있다.
- [4] 한편, 약재로서 하수오는 간기능 강화, 동맥경화 예방, 혈액순환 장애 개선, 원기 회복에도 도움이 되는 것으로 알려져 있으며, 피부에도 좋고, 뼈와 근육을 튼튼하게 하고, 신경쇠약이나 불면증에도 도움이 되는 등 다양한 약리 작용 및 효능 연구는 다수 진행되어 보고된 바 있다.
- [5] 이와 같이 하수오는 약리작용 및 효능연구는 다수 진행되었지만, 영양체를 기반으로 하는 무병주 식물체 생산 및 표준 육묘 생산에 관한 기술 개발은 거의 진행되지 않았다. 전통의학과 대체의학에 관심이 높아지면서 다양한 생물자원에 대한 효율적 활용이 사회적, 과학기술적으로 중요한 화두가 되고 있는 현 시점에서 약용으로 활용도가 높은 하수오의 덩이뿌리 비대 방법과 표준 육묘 생산 체계 구축은 체계적인 생산기술개발의 일환으로 미래 한약자원을 확보하고 선점하는데 큰 의의가 있다.
- [6] 또한, 하수오가 적하수오(赤何首烏)와 백하수오(白何首烏)로 구분된다는 잘못된 정보로 인하여 은조롱[학명 *Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl.]의 덩이뿌리인 백수오(白首烏, *Cynanchi Wilfordii Radix*)가 백하수오로 잘못 알려지게 되면서 백수오를 하수오로 인식하여 혼·오용되고 있으며, 1990년대 중반 은조롱에 비해 덩이뿌리의 성장이 빠른 중국 기원의 식물인

이엽우피소[중국명 우피소(牛皮消), 학명 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight]의 종자가 국내에 들어와 은조롱 대신 재배되고 있어 백수오 뿐만 아니라 하수오로 유통되면서 혼·오용 문제를 야기하고 있는 실정이다.

- [7] 백수오의 기원식물인 은조롱은 하수오와 달리 박주가리과의 다년생 초본으로 뿌리는 깊이 들어가며 방추형의 굵은 덩이뿌리를 형성하며 줄기는 왼쪽으로 감아 올라가며 마디가 없고 절단시 백색의 유액이 나온다. 하수오는 잎이 어긋나는 반면 은조롱은 마주난다. 잎의 모양은 삼각상의 심장형으로 끝이 뾰족하고 가장자리는 밋밋한 것이 특징이다. 하수오의 꽃이 원추형 화서인 반면 엽맥에 산형화서로 달리며 7~8월에 연한 황록색으로 핀다. 꽃의 형태는 넓은 피침형이고, 꽃받침이 5개이며, 꽃부리가 5개이고, 열편은 안쪽으로 구부러져 있는 것이 특징이다.

- [8] 이엽우피소는 은조롱과 같은 마디풀과 식물로 은조롱과 식물의 형태가 매우 유사하여 구별이 쉽지 않다. 이엽우피소의 줄기는 은조롱과 같이 덩굴성으로 마주나며 마디가 없고 엽병이 길다. 잎은 넓은 형으로 양측이 둥근 귀 모양이고 아래로 처졌거나 안쪽으로 구부러져 있으며 끝이 뾰족하고 밋밋한 것이 특징이다. 꽃은 엽맥이 취산화서로 달리고 8~10월에 황백색으로 피는데 꽃받침과 꽃잎은 5개로 갈라지는 것은 은조롱과 같으나 꽃받침이 아래로 구부러져 있는 것이 특징이다. 형태적으로 구별이 어려운 은조롱과 이엽우피소의 감별은 개화기 꽃의 모양으로 구별하는 것이 일반적이다. 은조롱의 꽃은 황록색으로 개화시 꽃받침이 뒤로 젖혀지지 않는 특징을 가지는 반면 이엽우피소는 꽃이 황백색이고 개화시 꽃받침이 뒤로 젖혀진다.

- [9] 한편, 하수오 재배 또는 배양 관련 기술의 일례로는 한국등록특허 제1272092호에 하수오 재배방법이 개시되어 있고, 한국임학회지(J. Korean For. Sor. (2011) Vol. 100. No. 2, pp172~177)에 액아배양을 통한 야생 백하수오 기내 증식에 관해 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2010-0114741호에 하수오 재배방법 및 그 방법으로 재배되는 하수오가 개시되어 있으나, 본 발명의 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를 이용하는 하수오의 대량 생산방법에 관한 기술은 개시된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를 이용하는 종묘 대량 생산방법에 관한 것으로, 본 발명의 배지에서 하수오의 생장율이 우수하였고, 식물생장 조절제로 키네티ن 및 IAA 또는 키네티ن 및 NAA를 첨가하였을 때 덩이뿌리 분화가 증진되는 것을 확인하였으며, 주요 무기염류의 함량을 증진시킴으로써 덩이뿌리 분화뿐만 아니라 토양 순화가 잘 이루어지는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 , NH_4NO_3 , 클리신, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)를 유효성분으로 포함하는 하수오 기내배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 하수오 기내배양용 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 대량 생산방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 하수오의 대량 생산방법으로 생산된 하수오의 조직배양묘를 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명은 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를 이용하는 종묘 대량 생산방법에 관한 것으로, 본 발명의 배지에서 하수오의 생장율이 우수하였고, 식물생장 조절제로 키네티 및 IAA, 또는 키네티 및 NAA를 첨가하였을 때 덩이뿌리 분화가 증진되는 것을 확인하였으며, 주요 무기염류의 함량을 증진시킴으로써 덩이뿌리 분화뿐만 아니라 토양 순화가 잘 이루어지는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를 이용하는 하수오의 대량 생산에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 하수오 종자로부터 계대배양을 통해 하수오 기내배양체를 유도할 수 있다는 것을 확인한 것이다. A는 하수오 종자이고, B~D는 소독 종자 치상(1주일)한 것이며, E는 소독 후 1주일 된 Seedling, F는 2주 차 explant, G는 확보된 기내배양체(하수오)이다.
- [16] 도 2는 하수오의 최적 배양을 위한 배지별(배지 1 내지 배지 10) 생장율을 확인한 것이다.
- [17] 도 3은 하수오의 최적배지(배지 7) 조건 하에서 덩이뿌리 분화능이 우수한 식물생장 조절제를 확인한 것이다. Con.은 대조구로서 식물생장조절제를 처리하지 않은 것이고, GA3는 지베렐린 A3를 처리한 것이며, 2ip는 이소펜테닐 아데닌(isopentenyl adenine)을 처리한 것이고, TDZ는 티이디아주론(thidiazuron)을 처리한 것이며, Kinetin은 키네티를 처리한 것이고, BA는 벤질아데닌(benzyladenine)을 처리한 것이다. 각각의 처리는 0.1, 0.5, 1.0 또는 2.0ppm의 농도로 처리하였다.
- [18] 도 4는 식물생장조절제의 종류 및 농도의 조합에 따른 하수오 덩이뿌리 분화 효과를 확인한 것이다.
- [19] 도 5는 하수오 최적배지에 포함된 무기염류의 함량을 증가시켜 배양한 효과를 나타낸 것이다. Day1은 기내 배양 후, 순화 1일째의 덩이뿌리를 나타낸 것이고, 4

- weeks는 토양 이식 후 4주 경과한 하수오 사진이다. Bar는 2cm를 의미한다.
- [20] 도 6은 하수오 최적 기내배양 조건에서 확인된 최적배지(배지 7) 및 식물생장 조절제(1.0ppm의 키네티ن 및 옥신계 호르몬인 1.0ppm의 IAA 또는 0.5ppm의 NAA)의 처리에 따른 덩이뿌리 비대 효과를 확인한 사진이다. Day 0은 기내배양 직후이고, 5 weeks는 5주 동안 순화시킨 후의 사진이며, 16 weeks는 토양 이식 후 16주 경과한 상태의 사진이다. Bar는 2cm를 의미한다.
- [21] 도 7은 하수오 최적배양묘의 토양 순화과정을 나타낸 것이다. A는 하수오 조직배양된 모습이고, B는 순화 전처리이며, C는 하수오 조직배양묘(Day 0)이고, D는 토양에 이식된 모습이며, E는 순화 중 온도 및 습도를 유지하는 모습이고, F는 토양 이식 후 4주 경과한 모습이며, G는 순화된 건전묘의 전체 모습이다.
- [22] 도 8은 무병주 하수오 배양묘의 포장 정식 후 덩이뿌리 형성까지의 생장 과정을 나타낸 사진이다. A는 멀칭(mulching)한 포장 육묘장 사진이고, B는 무병주 하수오 배양묘이며, C는 포장 정식(Day 1)한 사진이고, D는 포장 정식 후 11주 경과한 사진이며, E는 포장 정식 후 16주 경과한 사진이고, F는 포장 정식 후 20주 경과 후의 덩이뿌리 사진이다.
- [23] 도 9는 실생묘(A), 삽목묘(B) 및 본 발명의 조직배양묘(C)를 6개월 동안 재배하여 생산한 하수오의 사진 및 하수오 표준육묘에서 뿌리의 출아 모습(D)을 나타낸 사진이다.
- [24] 도 10은 실생묘, 삽목묘 및 본 발명의 조직배양묘를 6개월 동안 재배하여 생산한 하수오의 사진이다.
- [25] 도 11은 실생묘, 삽목묘 및 본 발명의 조직배양묘를 6개월 동안 재배하여 생산한 하수오의 뿌리길이(A), 표면적(B) 및 생체중(C)을 비교한 결과이다.
- [26] 도 12는 실생묘, 삽목묘 및 본 발명의 조직배양묘를 6개월 동안 재배하여 생산한 하수오의 건조 전후의 사진(A), 건조 중(dry weight)(B) 및 물 함량과 실제 중량의 비율(%)(B)을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 본 발명은 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 , NH_4NO_3 , 글리신, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신(hydrochloride(Pyridoxine HCl) 및 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)를 유효성분으로 포함하는 하수오 기내배양용 배지 조성물에 관한 것이다.
- [28] 상기 하수오 기내배양용 배지 조성물은 하수오 기내배양 묘의 덩이뿌리 비대용인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다. 상기 덩이뿌리는 하수오의 약용부위로 사용되는 것을 의미한다.
- [29] 상기 유효성분 이외에 추가로 식물생장조절제를 더 포함하는 것이 바람직하며, 바람직한 식물생장조절제의 일례로는 키네티인과 IAA(indole-3-acetic acid) 또는 키네티인과 NAA(1-naphthaleneacetic acid)가 있으나 이에 한정하지 않으며,

식물생장조절제의 함량은 0.01~5.0ppm의 키네티인과 0.75~5.0ppm의 IAA이거나 또는 0.01~5.0ppm의 키네티인과 0.01~0.8ppm의 NAA인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 0.1~2.0ppm의 키네티인과 1.0~2.0ppm의 IAA이거나 또는 0.1~2.0ppm의 키네티인과 0.1~0.5ppm의 NAA인 것이며, 가장 바람직하게는 1.0ppm의 키네티인과 1.0ppm의 IAA이거나 또는 1.0ppm의 키네티인과 0.5ppm의 NAA인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

- [30] 상기 유효성분의 함량은 0.125~0.375mg/l의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 18.35~55.05mg/l의 FeNaEDTA , 3.1~9.3mg/l의 H_3BO_3 , 11.15~33.45mg/l의 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.125~0.375mg/l의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.3~12.9mg/l의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 36.25~326.25mg/l의 CaCl_2 , 235.63~706.89mg/l의 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 85~255mg/l의 KH_2PO_4 , 495~4455mg/l의 K_2SO_4 , 90.27~270.81mg/l의 MgSO_4 , 200~600mg/l의 NH_4NO_3 , 1~3mg/l의 글리신, 50~150mg/l의 미오이노시톨(myo-Inositol), 0.25~0.75mg/l의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.25~0.75mg/l의 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 0.5~1.5mg/l의 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 상기 배지 성분 중에서 CaCl_2 의 함량은 108.75~326.25mg/l이고, K_2SO_4 의 함량이 495~1485mg/l이거나; CaCl_2 의 함량은 36.25~108.75mg/l이고, K_2SO_4 의 함량이 1485~4455mg/l인 것이 더 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [31] 본 발명에서의 하수오(생약명: Polygoni Multiflori Radix, 영문 약명: Polygonum Multiflorum Root, 대한민국약전: Polygonum Multiflorum Root, 일본약국방: Polygonum Root, 대만위생서: Fleeceflower Root라고 함)는 마디풀과 덩이뿌리를 의미한다.
- [32] 또한, 본 발명은 상기 하수오 기내배양용 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 대량 생산방법에 관한 것이다.
- [33] 상기 배양의 조건은 20 내지 27°C의 온도, 3,000~7,000Lux의 광도 및 16/8 시간의 명/암 주기의 조건인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 조직배양 묘를 배양하는 단계 이후에, 토양에 순화시키는 단계를 추가로 포함하는 것이지만 이에 한정하지 않는다.
- [34] 또한, 본 발명은 상기 하수오의 대량 생산방법으로 생산된 하수오의 조직배양묘에 관한 것이다. 상기 하수오의 조직배양묘는 하수오의 기내 식물체를 포함하는 것을 의미한다.
- [35] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [36] 실시예 1. 하수오 기내 무균 식물체 유도
- [37] 하수오 기내 무균 식물체 유도를 위하여 종자의 외피를 제거한 후 70% (v/v)

에탄올에 30초간 침지한 뒤 멸균수로 세척하고 3%(v/v) NaOCl(sodium hypochlorite) 용액에 5분씩 2회 총 10분간 표면살균 하였다. 멸균수에 5회 이상 충분히 세척한 후 여과지(filter paper) 위에서 건조한 종자를 20ml의 MS (Murashige & Skoog) 고체 배지에 치상하였다. 기본 배지는 3%(w/v) 자당(sucrose)과 0.45%(w/v) 한천(phyto agar)(MB Cell, USA)가 첨가된 MS 배지를 사용하였으며 pH는 5.6~5.8로 조정된 후 121°C에서 15분간 고압 멸균하여 사용하였다. 배양은 내부온도 25±1°C, 광도 5,000 lux의 16/8h(light/dark) 조건의 배양기 내에서 이루어졌으며 종자에서 발아된 식물체는 상기 배지와 동일 조건의 새로운 배지로 계대 배양하여 증식시켜 하수오 기내 배양체를 유도하였다.

- [38] 도 1에 개시한 바와 같이, 하수오 종자를 멸균배지에 치상하고, 발아 및 증식을 통해 기내 배양체를 생산하였다.
- [39] 실시예 2. 배지 구성에 따른 하수오 기내 배양체 생산
- [40] 하수오 기내 배양체 생산을 위한 적합한 배지 구성을 알아보기 위해서 다양한 배지 조건 하에서 하수오 기내 배양을 실시하였다. 본 발명에서 사용된 배지는 모두 Duchefa에서 구입하였으며, 3%(w/v)의 자당(sucrose)과 0.45%(w/v)의 한천(phyto agar)을 첨가하여 사용하였다.
- [41] 본 실시예 2에서는 하수오 기내 배양을 위하여 10종의 배지(배지 1~10)를 이용하여 배양하였다. 본 발명에서 사용된 배지는 모두 Duchefa에서 구입하였으며, 3%(w/v)의 자당(sucrose)과 0.45%(w/v)의 한천(phyto agar)을 첨가하여 사용하였다.
- [42] 본 실시예 2에서 사용한 배지 1은 1650mg/l의 NH_4NO_3 , 1900mg/l의 KNO_3 , 440mg/l의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 370mg/l의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 170mg/l의 KH_2PO_4 , 0.83mg/l의 KI, 6.2mg/l의 H_3BO_3 , 22.3mg/l의 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 8.6mg/l의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25mg/l의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02mg/l의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.025mg/l의 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 43mg/l의 Ferric-EDTA, 3%의 자당(sucrose), pH 5.7, 100mg/l의 이노시톨(inositol), 0.5mg/l의 니코틴산(nicotinic acid), 0.5mg/l의 피리독신(pyridoxine-HCl), 0.4mg/l의 티아민(thiamin-HCl), 1~30mg/l의 IAA(indoleacetic acid) 및 0.04~10mg/l의 키네티(Kinetin)으로 이루어진 배지이고,
- [43] 배지 2는 2500mg/l의 KNO_3 , 150mg/l의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 250mg/l의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 134mg/l의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 150mg/l의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75mg/l의 KI, 3.0mg/l의 H_3BO_3 , 10mg/l의 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.0mg/l의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25mg/l의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.025mg/l의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.025mg/l의 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 43mg/l의 Ferric-EDTA, 2%의 자당(sucrose), pH5.5, 100mg/l의 이노시톨(inositol), 1.0mg/l의 니코틴산(nicotinic acid), 1.0mg/l의 피리독신(pyridoxine-HCl), 10mg/l의 티아민(thiamine-HCl), 0.1mg/l의 키네티(Kinetin), 0.1~1.0mg/l의 2,4-D으로 이루어진 배지이며,
- [44] 배지 3은 2830mg/l의 KNO_3 , 463mg/l의 황산암모늄(ammonium sulphate), 166.02mg/l의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 90.37mg/l의 MgSO_4 , 400mg/l의 KH_2PO_4 , 3.33mg/l의

- MnSO₄·H₂O, 1.60mg/l의 붕산(boric acid), 0.80mg/l의 KI, 1.5mg/l의 ZnSO₄·7H₂O, 37.26mg/l의 Ferrous sulphate·7H₂O, 1.0mg/l의 EDTA disodium salt·2H₂O, 0.5mg/l의 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine hydrochloride), 0.5mg/l의 니코틴산(Nicotinic acid), 2.0mg/l의 글리신(Glycine)으로 이루어진 배지이며,
- [45] 배지 4는 0.025mg/l의 CoCl₂·6H₂O, 0.025mg/l의 CuSO₄·5H₂O, 36.7mg/l의 FeNaEDTA, 6.2mg/l의 H₃BO₃, 0.83mg/l의 KI, 16.90mg/l의 MnSO₄·H₂O, 0.25mg/l의 Na₂MoO₄·2H₂O, 8.6mg/l의 ZnSO₄·7H₂O, 270.00mg/l의 KH₂PO₄, 1800mg/l의 KNO₃, 175.79mg/l의 MgSO₄, 166mg/l의 CaCl₂, 400mg/l의 NH₄NO₃, 100mg/l의 미오이노시톨(myo-Inositol), 0.4mg/l의 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)으로 이루어진 배지이고,
- [46] 배지 5는 0.001mg/l의 CuSO₄·5H₂O, 3.47mg/l의 FeSO₄·7H₂O, 1.5mg/l의 H₃BO₃, 0.75mg/l의 KI, 5.31mg/l의 MnSO₄·H₂O, 0.0001mg/l의 MoO₃, 200mg/l의 Na₂SO₄, 2.67mg/l의 ZnSO₄·7H₂O, 208.47mg/l의 Ca(NO₃)₂·anhydrous, 65mg/l의 KCl, 80mg/l의 KNO₃, 351.6mg/l의 MgSO₄, 16.8mg/l의 NaH₂PO₄으로 이루어진 배지이며,
- [47] 배지 6은 0.0025mg/l의 CoCl₂·6H₂O, 0.0025mg/l의 CuSO₄·5H₂O, 36.7mg/l의 FeNaEDTA, 10.62mg/l의 H₃BO₃, 1.58mg/l의 KI, 1.68mg/l의 MnSO₄·H₂O, 0.0025mg/l의 Na₂MoO₄·2H₂O, 1.06mg/l의 ZnSO₄·7H₂O, 226.50mg/l의 CaCl₂, 600mg/l의 KCl, 2000mg/l의 KNO₃, 244.33mg/l의 MgSO₄, 250mg/l의 NaH₂PO₄, 400mg/l의 (NH₄)₂SO₄, 100mg/l의 미오이노시톨(myo-Inositol), 1.0mg/l의 니코틴산(Nicotinic acid), 1.0mg/l의 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 10.0mg/l의 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)로 이루어진 배지이고,
- [48] 배지 7은 0.25mg/l의 CuSO₄·5H₂O, 36.7mg/l의 FeNaEDTA, 6.2mg/l의 H₃BO₃, 22.3mg/l의 MnSO₄·H₂O, 0.25mg/l의 Na₂MoO₄·2H₂O, 8.6mg/l의 ZnSO₄·7H₂O, 72.50mg/l의 CaCl₂, 471.26mg/l의 Ca(NO₃)₂·4H₂O, 170mg/l의 KH₂PO₄, 990mg/l의 K₂SO₄, 180.54mg/l의 MgSO₄, 400mg/l의 NH₄NO₃, 2.00mg/l의 글리신, 100mg/l의 미오이노시톨(myo-Inositol), 0.5mg/l의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.5mg/l의 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 1.0mg/l의 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)로 이루어진 배지이며,
- [49] 배지 8은 0.03mg/l의 CuSO₄·5H₂O, 36.70mg/l의 FeNaEDTA, 10mg/l의 H₃BO₃, 18.94mg/l의 MnSO₄·H₂O, 0.25mg/l의 Na₂MoO₄·2H₂O, 10mg/l의 ZnSO₄·7H₂O, 166mg/l의 CaCl₂, 68mg/l의 KH₂PO₄, 950mg/l의 KNO₃, 90.27mg/l의 MgSO₄, 720mg/l의 NH₄NO₃, 0.03mg/l의 바이오틴(biotin), 0.5mg/l의 엽산(Folic acid), 2.0mg/l의 글리신(Glycine), 100mg/l의 미오이노시톨(myo-Inositol), 5.0mg/l의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.5mg/l의 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 0.5mg/l의 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)로 이루어진 배지이고,

- [50] 배지 9는 0.025mg/l의 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025mg/l의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 36.7mg/l의 FeNaEDTA, 6.2mg/l의 H_3BO_3 , 0.08mg/l의 KI, 0.76mg/l의 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.25mg/l의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.6mg/l의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 578.92mg/l의 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{anhydrous}$, 270.00mg/l의 KH_2PO_4 , 1800mg/l의 KNO_3 , 175.79mg/l의 MgSO_4 , 400mg/l의 NH_4NO_3 , 100mg/l의 미오이노시톨(myo-Inositol), 0.4mg/l의 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)으로 이루어진 배지이며,
- [51] 배지 10은 0.025mg/l의 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025mg/l의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 73.4mg/l의 FeNaEDTA, 6.2mg/l의 H_3BO_3 , 0.3mg/l의 KI, 16.90mg/l의 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.25mg/l의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.6mg/l의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 332.02mg/l의 CaCl_2 , 480mg/l의 KNO_3 , 180.54mg/l의 MgSO_4 , 330.60mg/l의 NaH_2PO_4 , 400mg/l의 NH_4NO_3 로 이루어진 배지이다.
- [52] 본 실시예 2의 결과로, 하기에 명시된 식 (1)에 따른 생장율을 기준으로 최적의 배지를 선별하였으며, 이하 실시예에서는 본 발명의 하수오 배양용 배지를 이용하였다.
- [53] 식 (1)
- [54] 생장율(Growth Index, %)=[(최종 성장 - 최초 성장)/최초 성장] $\times$ 100
- [55] 결과는 도 2에 개시한 바와 같이, 10종의 배지 중에서 배지 7의 생장율이 가장 우수한 것으로 나타났다. 따라서 배지 7을 최적배지로 선정하였다.
- [56] 실시예 3. 식물 생장 조절제의 종류 및 농도에 따른 하수오 분화능 확인
- [57] 최적배양을 위한 생장율과 더불어 덩이뿌리 분화를 위한 식물 생장 조절제의 종류 및 농도를 최적화하였다.
- [58] 식물 생장 조절제 중에서 하수오의 분화능을 증진시키는데 효과적인 사이토키닌(cytokinin)계 식물 호르몬으로, 뿌리 분화(Rooting)에는 1.0ppm의 키네티(Kinetin)이 효과적이라는 것을 확인하였다(도 3). 상기 사이토키닌은 뿌리 끝에서 생합성되며, 식물 분열조직의 세포분열을 촉진하므로 옥신과 함께 조직 배양에 이용된다. 휴면타파 작용을 하며, 식물조직의 노화를 억제한다. 잎과 결눈의 생장을 촉진하고, 잎과 과일의 노화를 방지한다.
- [59] 또한, 하수오는 덩이뿌리를 약용으로 사용하므로 옥신(Auxin)계 식물 호르몬을 추가적으로 첨가하여 덩이뿌리 생육을 측정하였다.
- [60] 구체적으로, 하수오 배양의 최적 배지(배지 7), 사이토키닌계 식물 호르몬별 처리구에서 효과가 있었던 처리구인 A군(배지 7 + 1.0ppm의 키네티(Kinetin)), B군(배지 7 + 1.0ppm의 키네티(Kinetin) + 1.0ppm의 TDZ + 0.1ppm의 2iP)을 고정시키고, 옥신계(IBA: indole-3-butyric acid, IAA: indole-3-acetic acid, NAA: 1-naphthaleneacetic acid, IPA: Indole-3-propionic Acid) 식물 호르몬을 농도별로 처리하여 덩이뿌리 분화를 측정하였다.
- [61] 식물 생장 조절제를 이용한 하수오의 덩이뿌리 분화능은(뿌리 생장 및 개수) 본 발명의 배지 7에 1.0ppm의 Kinetin 및 1.0ppm의 IAA가 첨가된 것과 본 발명의 배지 7에 1.0ppm의 Kinetin 및 0.5ppm의 NAA가 첨가된 처리구에서 효과가 좋은

것으로 확인되었다(도 4).

[62] 실시예 4. 약용 부위 비대 조건 확립

[63] 1) 무기염의 효과

[64] 하수오의 약용부위는 덩이뿌리이므로 덩이뿌리를 비대 시킬 수 있는 조건이 중요하다. 따라서 최적 배지별 효과에서 확인되었던 생장 최소배지인 배지 9와 생장 최대배지인 배지 7의 구성 무기염을 비교하여 각 무기염이 미치는 영향을 통해 덩이뿌리 비대를 촉진하고자 하였다. 본 발명의 배지인 배지 7에서 주요 무기염인 CaCl_2 217.5mg/l(배지 1에 포함된 CaCl_2 의 3배)를 첨가한 것과 K_2SO_4 2,970mg/l(배지 7에 포함된 K_2SO_4 의 3배)를 첨가하였고, 배지 9의 주요 무기염인 KNO_3 5,400mg/l(배지 9에 포함된 KNO_3 의 3배)를 첨가하여 덩이뿌리 비대 효과를 비교하였다.

[65] 비교 결과, 도 5에 개시한 바와 같이 본 발명의 배지에 217.5mg/l의 CaCl_2 (배지 7에 포함된 CaCl_2 의 3배)를 첨가한 경우와 2,970mg/l의 K_2SO_4 (배지 7에 포함된 K_2SO_4 의 3배)를 첨가한 경우, 덩이뿌리 비대가 증진되었지만, 배지 9의 주요 무기염인 5,400mg/l의 KNO_3 (배지 9에 포함된 KNO_3 의 3배)를 첨가한 경우, 뿌리가 거의 생성되지 않은 것을 확인하였다. 이로부터 KNO_3 의 경우 뿌리 분화에 악영향을 끼치는 것으로 판단하였다.

[66] 2) 호르몬의 효과

[67] 하수오 최적 기내 배양 조건에서 확인된 배지와 식물 생장 조절제의 처리구를 바탕으로 실질적으로 덩이뿌리 비대효과를 토양에 적용하여 확인하였다.

[68] 배지 7 및 처리구 1(배지 7 + 1.0ppm의 키네티(Kinetin) + 1.0ppm의 IAA), 처리구 2(배지 7 + 1.0ppm의 키네티(Kinetin) + 0.5ppm의 NAA)을 환경적응 한 후, 원예상토에 옮겨심어 4개월 동안 모니터링한 결과, 덩이뿌리가 형성되어 호르몬을 처리하지 않은 대조구에 비해 덩이뿌리가 비대되는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[69] 실시예 5. 기외 환경적응 및 토양적응

[70] 다량 확보된 유기체를 통한 영양체 번식은 하기의 방법으로 순화 전처리 과정을 거친 후 환경적응 및 토양적응을 유도하였다. 7일간 비닐백을 덮어서 습도를 90%로 유지시켜 순화시키면서, 점차 덮개를 벗긴 후 22°C 생장상에서 생육한 결과 4주간의 환경적응 후 95% 생존율을 보였으며, 순화된 식물체는 덩이뿌리의 비대 및 증식과 토양 적응성이 높게 나타났다. 토양환경적응을 위해 펄라이트와 원예상토가 1:1의 비율로 혼합된 토양으로 이식하여 환경적응을 한 후 하수오의 배양묘를 대량 생산하였다(도 7).

[71] 실시예 6. 이식 및 정식(포장)

[72] 하수오 배양묘가 토양 활착된 이후 포장에 정식을 할 수 있으며, 국내 전 지역에서 정식가능하나, 월동을 하기 위해서, 10월 말(서리가 오기 전에 지상부를 잘라 주어야함)에 전정하여, 겨울동안 덩이뿌리의 유지가 가능하므로 냉해피해를 방지하는 것이 중요하다. 토양은 유기물 함량이 많으면서 배수가

잘되는 양토, 사질양토가 적합하며, 물 빠짐이 나쁘면 덩이뿌리가 부패하기 쉽기 때문에 주의해야 한다(도 8).

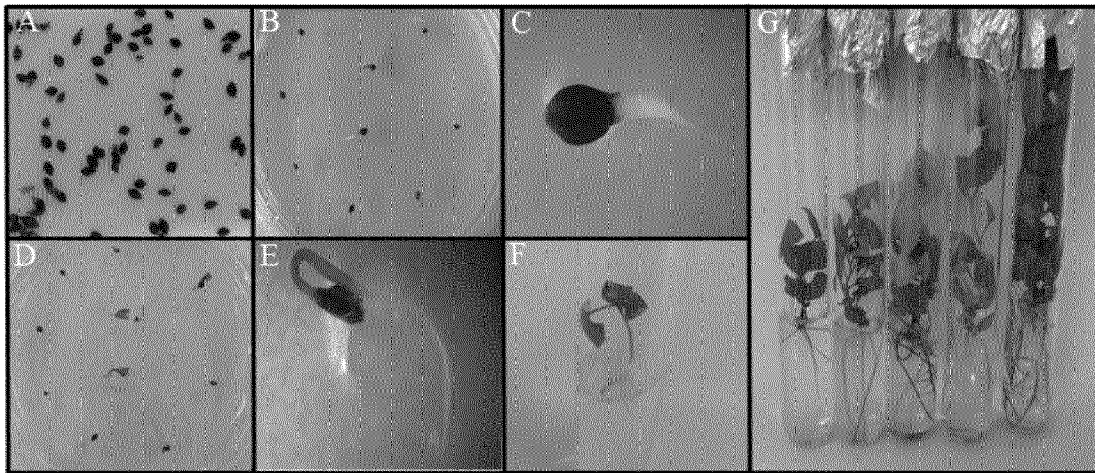
- [73] 본 실시예 6에서는 정식 후 6개월 동안 재배한 하수오 뿌리를 관찰한 결과, 도 9 내지 도 10에 개시한 바와 같이, 본 발명의 조직 배양묘로부터 생산된 하수오가 실생묘 또는 삽목묘로부터 생산된 하수오보다 비대하다는 것을 확인하였다. 또한, 하수오의 잔뿌리를 제거하기 전 후의 하수오 뿌리길이, 뿌리의 표면적 및 생체중(fresh weight)이 본 발명의 조직배양묘에서 생산된 하수오가 실생묘 또는 삽목묘로부터 생산된 하수오보다 우수하다는 것을 확인하였으며(도 11), 생산된 하수오의 건조중량도 삽목묘 또는 실생묘에 비해, 무겁고, 물의 함량이 적다는 것을 확인함으로써, 본 발명의 조직배양묘를 이용하는 경우, 비대한 하수오를 대량생산 할 수 있다는 것을 확인하였다(도 12).

청구범위

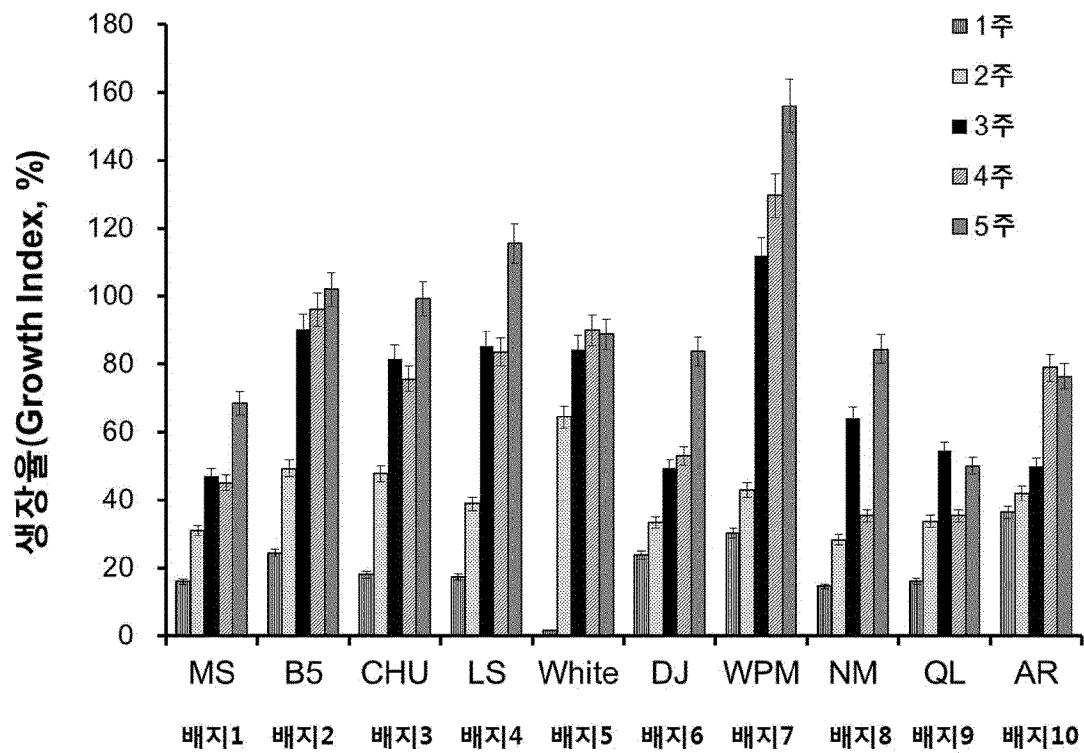
- [청구항 1] $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 , NH_4NO_3 , 글리신, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)를 유효성분으로 포함하는 하수오 기내배양용 배지 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 하수오 기내배양용 배지조성물은 하수오 기내배양 묘의 덩이뿌리 비대용인 것을 특징으로 하는 하수오 기내배양용 배지 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 추가로 식물생장조절제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 하수오 기내배양용 배지 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 식물생장조절제는 키네티과 IAA(indole-3-acetic acid) 또는 키네티과 NAA(1-naphthaleneacetic acid)인 것을 특징으로 하는 하수오 기내배양용 배지 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 식물생장조절제는 0.01~5.0ppm의 키네티과 0.75~5.0ppm의 IAA이거나 또는 0.01~5.0ppm의 키네티과 0.01~0.8ppm의 NAA인 것을 특징으로 하는 하수오 기내배양용 배지 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 식물생장조절제는 0.1~2.0ppm의 키네티과 1.0~2.0ppm의 IAA이거나 또는 0.1~2.0ppm의 키네티과 0.1~0.5ppm의 NAA인 것을 특징으로 하는 하수오 기내배양용 배지 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 유효성분의 함량은 0.125~0.375mg/l의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 18.35~55.05mg/l의 FeNaEDTA , 3.1~9.3mg/l의 H_3BO_3 , 11.15~33.45mg/l의 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.125~0.375mg/l의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.3~12.9mg/l의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 36.25~326.25mg/l의 CaCl_2 , 235.63~706.89mg/l의 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 85~255mg/l의 KH_2PO_4 , 495~4455mg/l의 K_2SO_4 , 90.27~270.81mg/l의 MgSO_4 , 200~600mg/l의 NH_4NO_3 , 1~3mg/l의 글리신, 50~150mg/l의 미오이노시톨(myo-Inositol), 0.25~0.75mg/l의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.25~0.75mg/l의 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 0.5~1.5mg/l의 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)인 것을 특징으로 하는 하수오 기내배양용 배지 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 0.1~2.0ppm의 키네티과 1.0~2.0ppm의 IAA 또는 0.1~2.0ppm의 키네티과 0.1~0.5ppm의 NAA를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 하수오 기내배양용 배지 조성물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 대량 생산방법.

- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 배양의 조건은 20 내지 27°C의 온도, 3,000~7,000Lux의 광도 및 16/8 시간의 명/암 주기 조건인 것을 특징으로 하는 하수오의 대량 생산방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 조직배양 묘를 배양하는 단계 이후에, 토양에 순화시키는 단계;를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 하수오의 대량 생산방법.
- [청구항 12] 제9항의 대량 생산방법으로 생산된 하수오의 조직 배양 묘.

[도1]



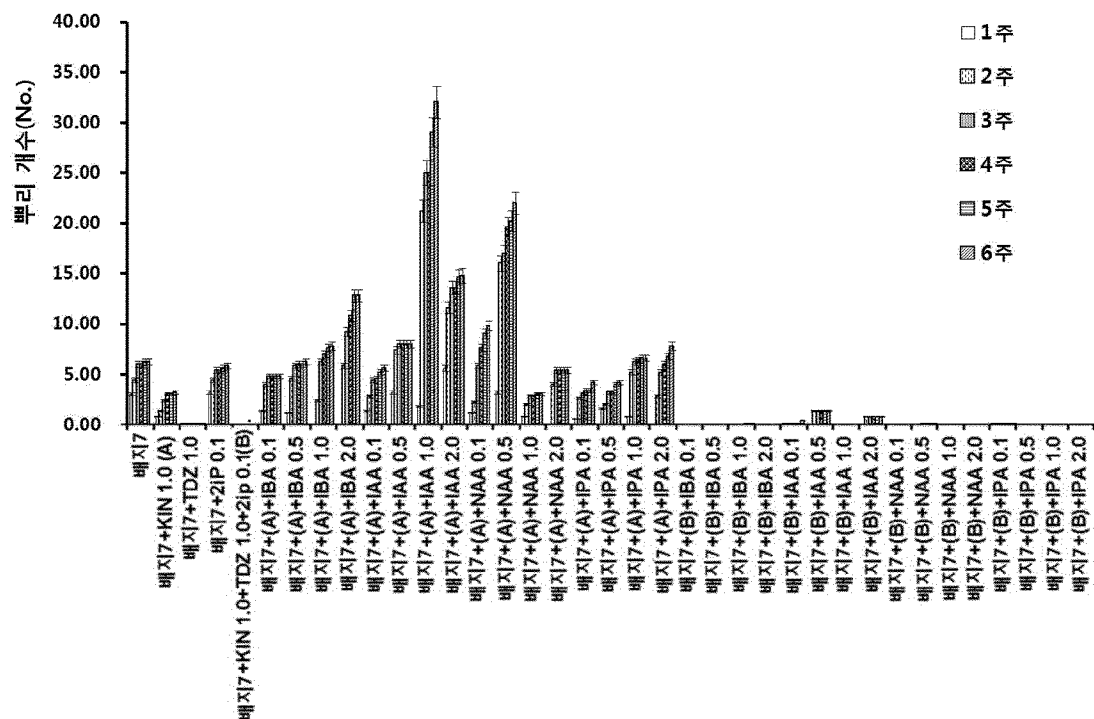
[도2]



(A)

(B)

[54]



[도5]

배지종류
무기염류

배지7

-

배지7

 K_2SO_4

배지7

 $CaCl_2$

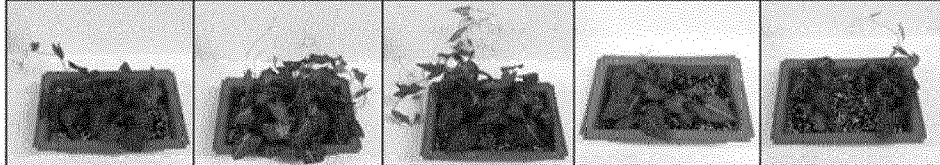
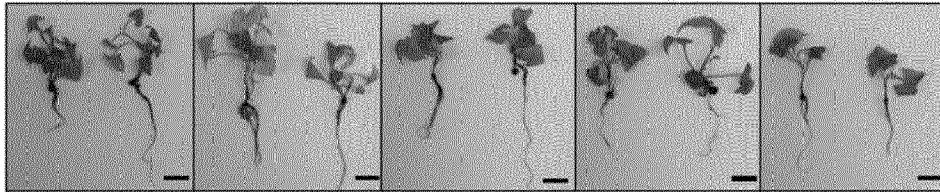
배지7

 KNO_3

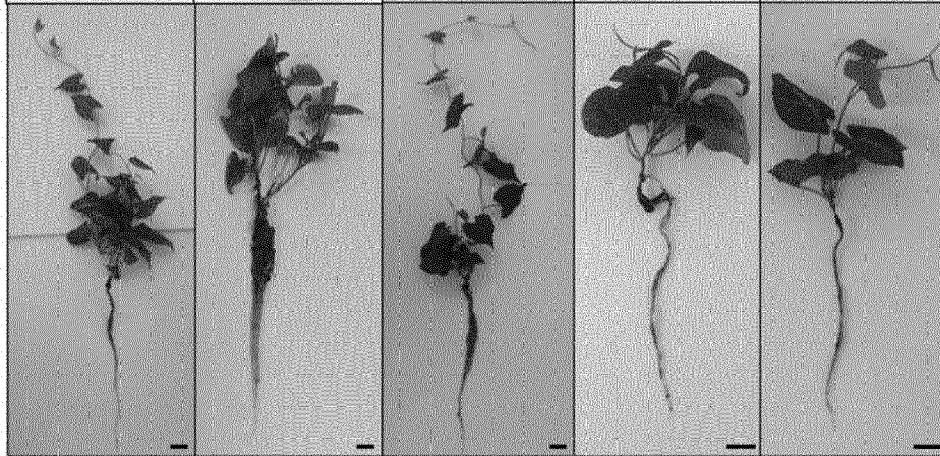
배지9

-

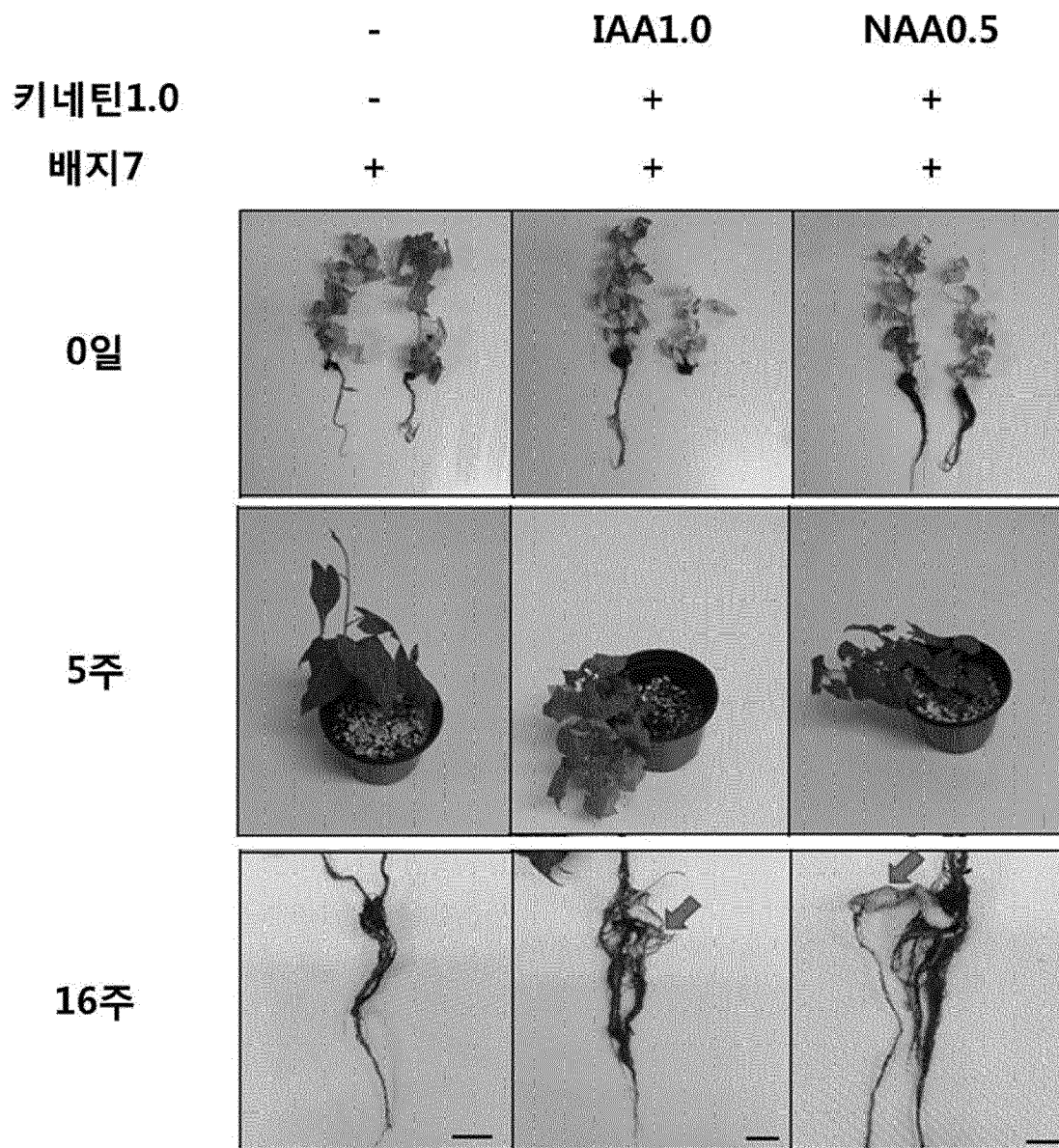
1일



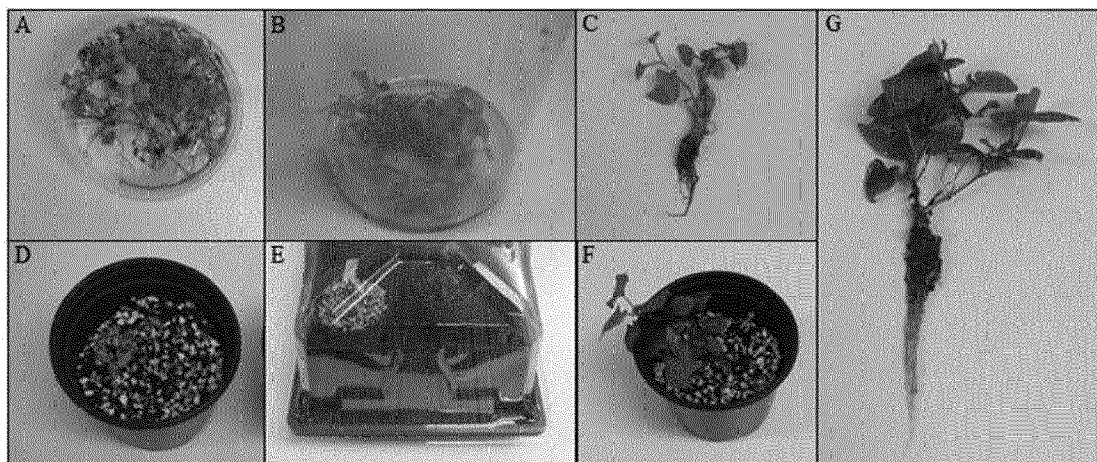
4주



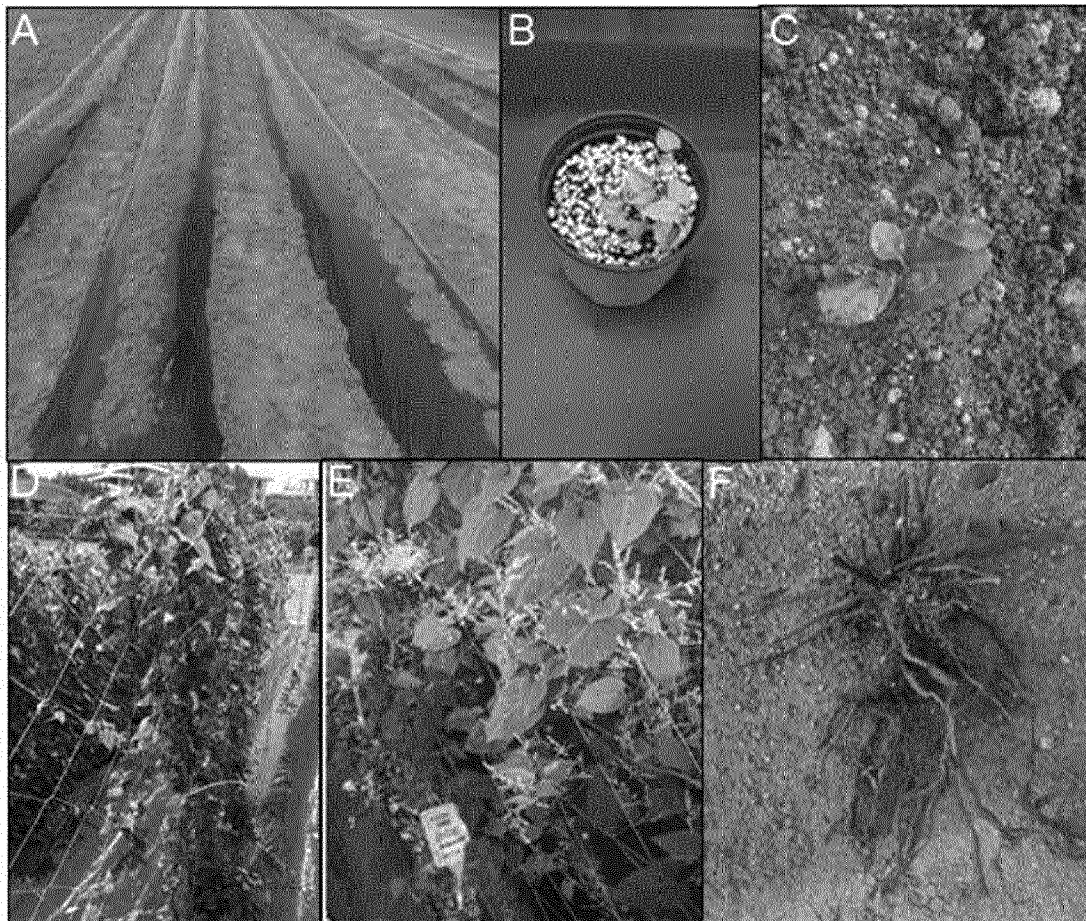
[도6]



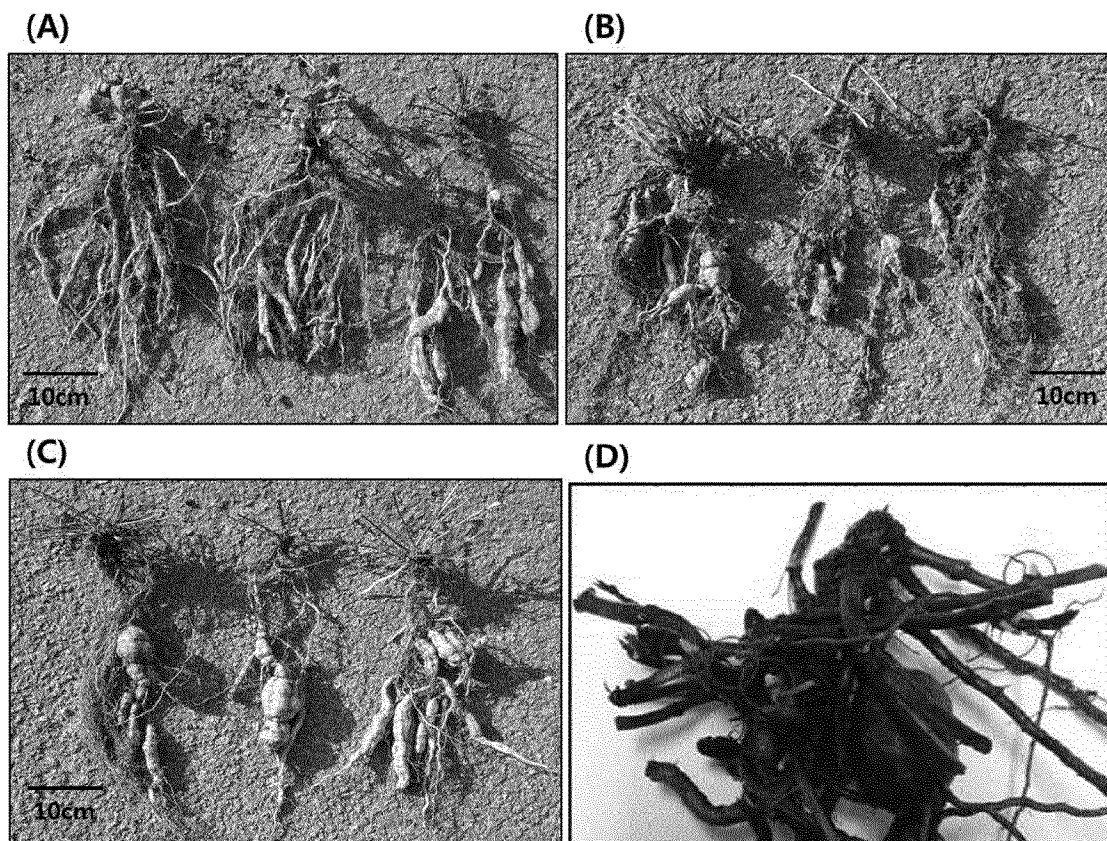
[도7]



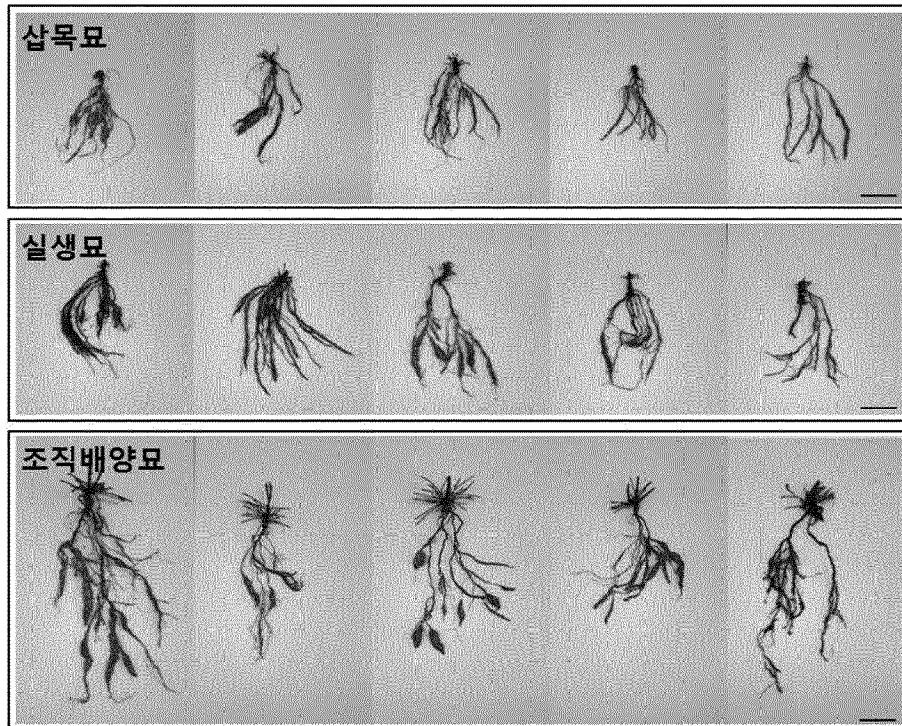
[도8]



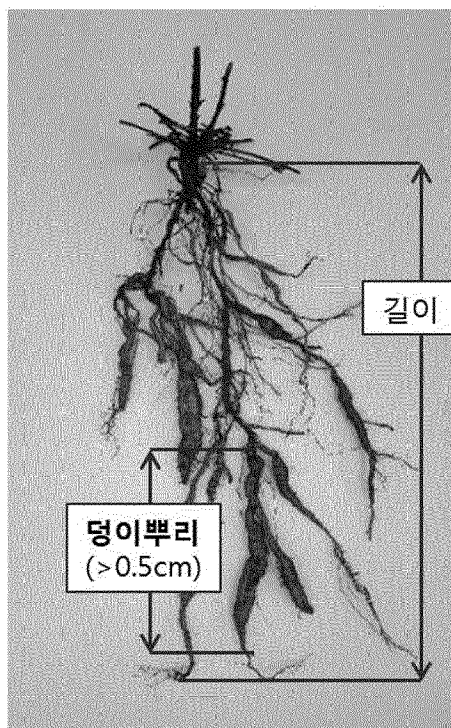
[도9]



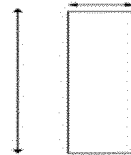
[도10]



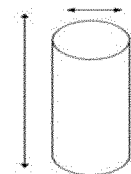
* Bar: 10cm



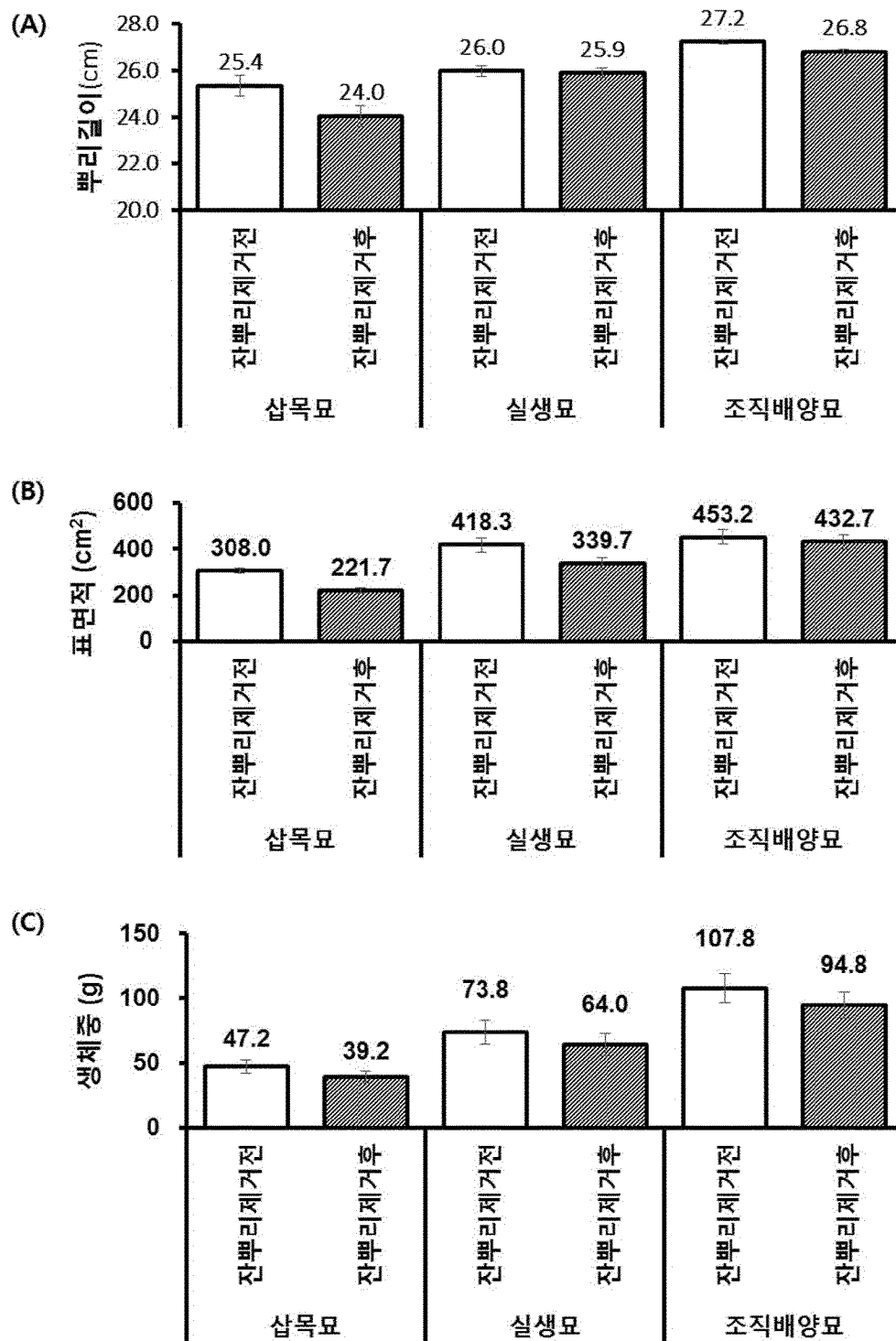
단면적(PA)



표면적(SA)

부피(vol, cm³)

[도11]



[도12]

