(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
*A01K 67/00* (2006.01)
*A01K 67/033* (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0035677
(43) 공개일자 2007년04월02일

(21) 출원번호 10-2005-0090359
(22) 출원일자 2005년09월28일
심사청구일자 2005년09월28일

(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자 송준임
서울특별시 종로구 청운동 106
황성진
서울특별시 강남구 논현동 223

(74) 대리인 특허법인다래

전체 청구항 수 : 총 8 항

# (54) 연산호류의 대량증식방법

(57) 요약

본 발명은 뿌리형성과정(root-like processes, RLPs)을 포함하는 연산호류의 대량 증식방법에 관한 것으로, 1) 증식시킬 연산호류를 모 군체로부터 채집(sampling)하는 단계, 2) 절단된 연산호류를 치유(healing)하는 단계, 3) 치유된 연산호류를 수송(transportation) 및 순응(accommodation)시키는 단계, 4) 순응된 연산호류 가지를 수온 22~25℃에서 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진시키는 단계, 5) 기질에 부착(attaching)시키는 단계, 및 6) 부착된 연산호류를 배양하는 단계를 포함하여 이루어진다.

본 발명의 대량증식방법은 기질부착 전단계에서 뿌리형성과정을 촉진시킴으로써 부착율 및 생존율을 높여 대량증식에 효과적이다.

대표도

도 2

## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

하기 단계를 포함하여 이루어지는 RLPs 형성을 포함하는 연산호류의 대량증식방법;

1) 증식시킬 연산호류를 모 군체로부터 채집(sampling)하는 단계, 2) 절단된 연산호류를 치유(healing)하는 단계, 3) 치유된 연산호류를 수송(transportation) 및 순응(accommodation)시키는 단계, 4) 순응된 연산호류 가지를 수온 22~25 ℃에서 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진시키는 단계, 5) 기질에 부착(attaching)시키는 단계, 및 6) 부착된 연산호류를 배양하는 단계.

## 청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 2)단계의 치유단계에서 치유는 에어펌프로 18~20시간 동안 산소와 수류를 공급하고, 수온은 16~18 ℃로 유지하는 것을 특징으로 하는 연산호류의 대량증식방법.

## 청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 3) 단계의 수송단계에서 수송시 이중 비닐 주머니 안에 100% 산소를 들어있는 해수량의 5배를 넣는 것을 특징으로 하는 연산호류의 대량증식방법.

## 청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 3) 단계의 순응단계는 22~25 ℃의 온도에 적응시킨 후, 자연해수 및 인공해수 1:1 혼합배양수에 적응시키는 것을 특징으로 하는 연산호류의 대량증식방법.

## 청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 4) 단계의 RLPs 촉진단계에서 수온은 23±1 ℃ 인 것을 특징으로 하는 연산호류의 대량증식방법.

## 청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 4) 단계의 RLPs 촉진단계에서 연속적으로 산소를 공급하는 것을 특징으로 하는 연산호류의 대량증식방법.

## 청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 5) 단계의 부착단계에서 부착기질은 석회석 기질인 다공성 현무암 또는 굴껍데기인 것을 특징으로 하는 연산호류의 대량증식방법.

## 청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 6) 단계의 배양단계에서 배양은 베를린 방식으로 대형 프로테인 스키머와 펌프가 설치된 배양 수조에서 수행하는 것을 특징으로 하는 연산호류의 대량증식방법.

명세서

# 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

## 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 연산호류의 대량증식방법에 관한 것이다.

"바다의 꽃"이라 불리우는 산호충류는 자포동물문(Cinidaria)의 산호충강(Anthozoa)에 해당하고, 팔방산호아강(Octocorallia) 및 육방산호아강(Hexacorallia)으로 나누어지며, 연산호류는 팔방산호아강에 속한다.

산호충류는 주로 수온이 따뜻하며 맑고 깨끗한 해역에 주로 서식하는데, 바다속에서 고착생활을 하며, 때로는 모래, 진흙속에 기부를 박고 살며 때로는 이동하는 것도 있고 또 부유하며 다소 헤엄치는 것도 있다.

이들의 번식은 플라눌라(planula) 유생이 고착하여 폴립이 되는 유성생식과 폴립이 분열 또는 출아를 되풀이하여 대형의 군체를 이루는 무성생식이 있다(한국동물분류학회 편저, 동물분류학, 집현전, p149, 2003).

이들 산호충류는 전 세계적으로 6,500여종이며, CITES(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)에서는 그 중 3,000여종을 무역 규제종으로 지정하고 있는 매우 중요한 분류군이다. 국내에서는 현재까지 134종이 보고 되어 있으며, 이들의 보호를 위하여 1998년에 환경부 지정 '한국의 멸종위기 및 보호야생 동·식물' 중 산호충류 15종이 보호야생종으로 지정된 바 있다. 또한, 지구 역사상 산호초 형성은 지구상에 생물이 살 수 있는 환경을 만들어 주었고, 현재도 산호 서식지는 어장이 형성되며, 다양한 생물들이 어울려 살 수 있는 생태학적으로 매우 중요한 연안 생태계이다.

온대 해역인 우리나라에서는 제주도 해역의 서귀포 문섬, 숲섬 및 범섬 일대에는 쿠로시오 난류의 영향으로 다양한 해양생물이 분포하는 독특한 해양생태계가 형성되어 있다. 이 지역은 조하대 암반 기질이 잘 발달되어 있어 다양한 부착생물이 서식하며, 특히 연산호, 돌산호 등이 군집을 이루고 있어 우리나라에서 종다양성(species diversity)이 가장 높은 지역으로 간주되고 있다. 이 지역의 화려한 연산호 군락 (soft coral community)은 열대나 아열대에서는 볼 수 없는 것으로 UNEP의 ICRI (International Coral Reef Initiative)에 2000년에 이미 보고되었을 뿐만 아니라, UNESCO 해양보존지역 위원회에서도 해양보호지역(Marine Protected Area, MPA)으로 선포되어 보호되고 있다.

그러나, 최근 이 연산호 군락지가 무분별한 채취와 어업, 잠수함 관광, 방파제 공사 등과 같은 산업활동에 의하여 급속도로 파괴되어가고 있다. 또한, 산호충류는 오랫동안 각종 보석이나 장식용으로 사용되면서 귀중한 산호자원이 고갈되어 왔고, 해양관광용이나 수족관용으로 이용되면서 위기에 처하게 되었다.

미국의 플로리다, 하와이, 괌에서는 대규모 산호 양식장을 건설하여 종 보존을 위한 사업과 관상용과 상업용 자원으로서 생산 개발하고 있으나, 주로 돌산호류의 대량 증식이 이루어지고 있으며, 연산호류에 대한 증식도 일부 시도되고 있다.

이에 본 발명자는 국내특허공개공보 제10-2005-3508호(2005.01.12공개)에서와 같이 한국산 산호충류의 대량 증식방법을 특허출원하였으며, 여기에서 1)산호충류의 군체를 절단하는 단계, 2)절단된 산호충류를 석회질을 함유한 기질에 부착하는 단계, 3) 적절한 수류를 공급하면서 배양하는 단계로 이루어지는 대량증식 방법에 관하여 개시한 바 있다.

그러나, 절단된 산호충류 가지가 기질에 부착하는 부착율에 따라 대량증식의 성공이 좌우되므로 부착 성공율을 더욱 높이려는 연구를 시도하였다.

더욱이 연산호류는 해양류와 달리 단단한 골축이 없기 때문에 부착이 용이하지 않으며 부착시 해양류나 해송류에서 사용한 접착제에 의한 부착으로는 그 성공률이 매우 낮기 때문에 보완된 방법이 필요하다.

특히, 연산호류를 증식시키는 방법의 성공은 기질 부착을 위한 뿌리형성과정(root-like processes, RLPs) 여부에 달려있다. 이는 연산호류를 증식시킬 때 절단면이 치유되었더라도 RLPs가 형성되지 않은 개체는 기질에 부착할 수 없기 때문이다.

따라서, 무성생식을 이용한 한국산 연산호류의 대량 증식방법에서 부착율을 높이기 위해 연구한 결과, 부착단계에서 뿌리형성과정을 촉진시키는 최적의 조건을 찾아 부착율을 높임으로써 대량증식이 활성화됨을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

## 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 뿌리형성과정을 포함하는 연산호류의 대량증식방법을 제공하고자 한다.

## 발명의 구성

본 발명은 뿌리형성과정을 포함하는 연산호류의 대량증식방법을 제공한다.

본 발명의 대량증식방법은, 1) 증식시킬 연산호류를 모 군체로부터 채집(sampling)하는 단계, 2) 절단된 연산호류를 치유(healing)하는 단계, 3) 치유된 연산호류를 수송(transportation) 및 순응(accommodation)시키는 단계, 4) 순응된 연산호류 가지를 수온 22~25℃에서 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진시키는 단계, 5) 기질에 부착(attaching)시키는 단계, 및 6) 부착된 연산호류를 배양하는 단계를 포함하여 이루어진다.

상기 연산호류는 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*), 밤수지맨드라미(*Dendronephthya castanea*), 자색수지맨드라미(*Dendronephthya putteri*), 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)를 포함한다.

본 발명의 대량증식방법에서, 상기 1)단계의 채집하는 단계는 자연서식처에서 건강한 모 군체에서 3~5cm정도 크기의 가지를 절단하는 과정으로, 인공절단 방법을 포함한다. 이 때 중요한 것은 모 군체의 선택과 절단이다. 모 군체를 선택할 때는 너무 작은 군체는 피하고 건강한 군체를 선택해야만 절단 후의 바이러스나 세균에 의한 감염으로부터 군체를 보호할 수 있다.

또한, 상기 1)단계에서 군체를 인공절단시 절단에 사용된 도구는 스테인레스 재질로 된 날카로운 가위가 바람직하다. 절단시에 날카로운 가위를 이용하여 절단 면적을 최소화함으로 모 군체와 절단 가지를 감염으로부터 보호할 수 있다.

본 발명의 대량증식방법에서, 상기 2)단계의 치유하는 단계는 수송전에 절단면이 치유되는 과정이다. 모 군체에서 절단된 가지는 절단면을 치유하기 위해 자체적으로 다량의 점액질을 분비한다. 본 발명의 치유 단계는 해수에 에어펌프 등으로 산소와 수류를 공급하여 점액질의 일부를 씻어 주어 폴립이 원활하게 가스교환을 하는 단계를 의미한다. 이 때, 에어펌프는 18~20시간 동안 산소와 수류를 공급하고, 수온은 16~18℃로 유지하는 것이 바람직하다. 치유 단계 없이 바로 수송을 하는 경우에는 분비된 다량의 점액질이 유기물질로 변하여 수질 조건을 악화시키기 때문에 수송 전에 치유 단계를 거치는 것이 채집된 가지의 생존율을 높일 수 있다.

본 발명의 대량증식방법에서, 상기 3)단계의 치유된 연산호류를 수송 및 순응시키는 단계는 상기 2)단계 이후 채집된 가지를 원하는 곳으로 수송하여 순응시키는 과정이다.

본 발명의 수송하는 단계는 치유된 가지들을 이중 비닐 주머니에 넣어 산소를 채운 상태에서 수송하는 과정이다. 이 때, 산소는 100% 산소가 바람직하고, 사용되는 산소량은 비닐 안에 들어있는 해수 양의 5배 정도가 바람직하다. 또한, 이중 비닐 주머니에 산소를 채운 후에는 산소가 새어나가지 않도록 비닐을 묶어주고 고무줄을 이용하여 이중으로 봉해주는 것이 바람직하다. 이중 비닐 주머니에 넣은 가지들은 큰 비닐에 넣어 다시 한 번 봉하여 운송시 물이 새는 경우를 미연에 방지한다.

또한, 운송시 표본들은 아이스박스에 넣는 것이 바람직하다. 이렇게 함으로써, 운송시 발생되는 온도 상승과 물리적 충돌에서 채집된 가지에 가해지는 충격이 완화될 수 있다. 또한, 표본들이 들어간 큰 비닐을 신문지로 덮고 얼음 팩을 이용하여 온도 상승을 방지한다.

또한, 표본을 포장하는 단계를 신속하게 하여 표본에 가해지는 충격을 최소화하고 운송시 발생하는 온도 상승을 막아 일정한 온도를 유지하는 것이 바람직하다.

본원발명의 적응단계는 표본을 배양수조의 온도와 배양액에 적응시키는 단계이다. 실험실로 운송된 표본은 비닐채로 배양수조에 30분간 넣어 22~25 ℃ 범위의 온도에 적응을 시키는 것이 바람직하다. 온도 적응이 끝나면 비닐을 개봉하여 담겨진 자연해수와 배양수(인공해수)를 1:1로 섞은 수조에 30분간 다시 순응시키는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명의 대량증식방법에서, 상기 4)단계의 뿌리형성과정촉진단계는 순응된 연산호류 가지를 최적의 온도 및 산소 공급 조건에 맞춰 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진시키는 단계이다.

상기 RLPs는 뿌리형성 과정(root-like processes, 이하 RLPs라고 한다)으로, 산호류를 절단하였을 경우, 절단면이 아물면서 식물 뿌리모양의 RLPs라는 돌기물이 만들어지고, 이 RLPs에 의해 절단면이 기질에 부착할 수 있다는 것으로 알려져 있다(Barneah et al., Invertebrate Biology, Vol.12(2), pp. 81-90, 2002). 이 때 적정수온은 22~25 ℃, 바람직하게는 23±1 ℃로 유지하는 것이 좋고, 연속적으로 산소를 공급하는 것이 바람직하다.

본 발명의 일 실시예에서, 연산호류 절단 7일 경과 후에 23℃에서 RLPs 형성률이 90% 이상으로 나타난 반면(도 2 참조), 저온 조건인 13℃, 18℃에서는 각각 10%, 50% 이하로 나타났고, 또한 고온 조건인 28℃에서는 온도 스트레스로 인하여 뿌리형성과정이 되기 이전에 실험개체의 치사율이 높게 나타나, 연산호류에서 RLPs 촉진을 위한 최적의 온도는 23℃ 임을 알 수 있다.

상기와 같이 온도 및 산소공급의 최적의 조건에서 배양하여, 절단 후 7일 정도가 경과하면 절단면에서 RLPs가 완전히 형성되어 기질에 부착할 수 있다.

본 발명의 대량증식방법에서, 상기 5)단계의 부착단계는 상기 RLPs 가 형성된 연산호류 가지를 기질에 부착시키는 단계를 의미한다.

이 때, 부착 기질은 칼슘을 다량 포함하고 있는 자연물질을 말하며, 굴껍데기, 다공성 현무암, 조개껍질, 산호조각, 바위 등이 될 수 있고, 특히 석회질을 함유한 굴 껍데기와 다공성 현무암이 바람직하다. 또한, 부착을 원활하게 하기 위하여 수류를 약하게 하여 물리적인 충격을 최소화하는 것이 바람직하다.

본 발명의 대량증식방법에서, 상기 6)단계는 기질에 부착된 연산호류를 배양하는 단계이다.

이 때, 베를린(Berlin) 방식의 배양수조를 이용하여 배양하는 것이 바람직하다. 베를린 시스템이란 생물학적 여과와 질소분해 작용을 라이브락 표면에 서식하는 호기성 및 혐기성 박테리아에 의지하고 있는 시스템으로, 수조 내 유기물을 프로테인 스키머(protein skimmer)로 제거하는 시스템이다.

연산호류인 분홍맨드라미의 경우에 베를린 방식으로 대형 스키머(skimmer)와 펌프(pump)가 설치된 배양 수조에서는 생존율이 100%인 반면, 단순 실험용 수조(산소공급장치만 설치)에서는 생존율이 현저히 감소한다. 이는 절단면에서 나온 점액질의 제거와 수질 안정화 시스템이 분홍바다맨드라미의 생존율에 직접적인 영향을 주었다고 볼 수 있다.

이러한, 본 발명의 대량증식방법은 기질부착 전단계에서 RLPs 형성의 최적의 조건(온도 22~25℃ 및 연속적인 산소공급)으로 조절하여 RLPs 형성율을 최대화함으로써 기질에 부착율 및 생존율도 최대화가 될 수 있으며, 연산호류 대량증식의 효율을 높이는 작용효과를 나타낸다.

따라서, 본 발명의 대량 증식 방법은 한국산 산호자원을 대량 증식시켜, 종 보전 및 생태계 복원은 물론, 신물질 연구나 유전학적 연구 등을 위한 종 확보 수단으로 직접 사용될 수 있으며, 관상용 해양 수조 사업의 내수와 수출로 경제성이 증대되는 효과를 가져다준다.

또한, 본 발명의 연산호류가 속하는 산호충류의 일반적인 배양 조건은 다음과 같다.

배양을 위해 한국산 산호충류가 서식하는 서식 해황에 맞추어 배양 조건을 맞추고, 그 과정 중에 다양한 조건 실험을 통해 종에 따라 사육에 적절한 조건을 찾는다.

첫째, 조명(lighting)은 모든 산호충류가 살아가는데 필수적이다. 그러나 산호충류의 종에 따라서 광의 의존 정도가 달라지며 각 종에 따라서 선호하는 광파장과 세기가 다르다. 산호충류는 종류에 따라 공생성 와편모충류(zooxanthellae)와 상리공생을 유지하며 밀접한 관계를 유지하는 것으로 알려져 있다.

둘째, 수질(water condition)은 산호충류 배양을 위하여 오염되지 않은 깨끗한 자연해수가 가장 최적이나, 대부분의 경우 자연해수를 얻기가 쉽지 않기 때문에 인공해수를 만들어 사용해야 한다. 인공해수를 만들 때는 질산염, 중금속 등의 수치를 고려해야 함으로 증류수나 탈이온화, 역삼투압수 등을 사용하는 것이 좋다.

또한, 산호충류의 노폐물로 인해 수조 내에서 암모니아, 아질산염, 질산염 등이 발생하며 이런 물질들이 수조 내에 과도하게 축적되면 산호충류에 해가 되는 조류(hair algae)와 박테리아들이 번성하게 된다. 그러므로 인공해수 자체는 암모니아, 아질산염, 질산염, 인산염, 구리 등이 존재하지 않고, 기타 조건들은 다음과 같이 수조 내에서 항상 적정범위로 유지되어야 한다.

[산호 수조를 위한 인공해수의 최적 조건]

- 암모니아($NH_3$, $NH_4$) : 0.009 mg/l 이하 유지

- 아질산염($NO_2$) : 0.1 mg/l 이하 유지

- 질산염($NO_3$) : 0.1 mg/l 이하 유지

- 인산염($PO_4$) : 항상 0값 유지(극소량으로 존재함을 의미함)

- 온도 : 22~23 ℃ 유지

- 수소이온 농도(pH) : 8.1~8.3 유지

- 알칼리성(용액의 산성화에 대한 완충의 정도를 의미): 3.0~3.5 meq/l

- 용존산소($O_2$) : 6-7 ppm

- 경도(Carbonate Hardness) : 7 dKH

- 염도(Salinity) : 32~35 ppt

- 칼슘(Calcium) : 350~400 ppm

- 구리(Copper) : 항상 0값 유지(극소량으로 존재함을 의미함)

인공해수는 1차 증류수와 산호 배양용 해염(제품명 예: Coralife Scientific Grade Marine Salt(Energy Savers Unlimited사), Red Sea Salt, Instant Ocean 등)을 섞어 염도 32~35ppt에 맞추어 제조한다. 수조 내 수질 상태는 항상 적정 범위 내에서 유지되어야 하기 때문에 여러 가지 시약들과 수질측정기를 이용하여 항상 수질 상태를 수시로 점검한다.

수조가 안정화되기 이전에는 모든 값들을 날마다 측정해야 한다. 그리고 일단 안정화가 되어 깨끗한 수질 상태를 유지하기 위해 수온, 염도, 수소 이온 농도, 용존 산소량은 날마다 검사하고, 암모니아, 아질산염, 질산염은 주 1회 씩, 인산염은 격주에 1회 씩 검사한다. 측정값이 적정 범위를 벗어나면 물갈이, pH 완충제 투여, 조명시간 조절 등의 방법을 통하여 문제를 해결한다.

셋째, 여과(filtration)는 수조 내에서 발생하는 유해한 암모니아를 얼마나 빨리 무해한 질소 가스로 바꾸어주는가에 목적이 있다. 여과에는 바이오볼, 라이브 락, 산호사 등의 여과제가 사용되며, 이 여과제에는 암모니아를 먹이로 하는 혐기성 및 호기성 여과 박테리아가 서식하여 암모니아를 제거해준다.

여과 방식에는 저면 여과, 역류 저면 여과, 드라이 여과, 베를린, 모나코, 아데니 방식 등 여러 가지가 있으며, 본 발명에서는 대형 단백질 제거기와 풍부한 라이브 락으로만 물을 여과하는 베를린 방식을 이용한다. 배양수조내에는 여과를 위한 라이브락과 산호사를 풍부하게 깔고, 프로테인 스키머(Protein skimmer)를 부착하여 수시고 세척해 주어야 한다.

넷째, 수류(water movement)는 산호 먹이섭취와 가스교환을 위해 필요하며, 라이브락에 노폐물이 쌓이고 조류가 붙는 것을 방지하기 위하여도 필요하다. 수류조건에 따라 먹이 섭식률과 성장률이 달라지기에 수류조건을 적절히 맞추어야 한다(Katharina E. Fabricus, 1995). 종에 따라 선호하는 수류속도가 달라지기에 배양종을 사육하며 선호환경을 파악하는 것이 매우 중요하다.

본 발명에서는 수중 모터를 이용하여 산호충류에 노폐물이 쌓이지 않도록 강한 수류를 만들어 준다. 수류를 강하게 해야 하는 종은 수중모터가 가까운 곳에 위치하게 하고, 수류를 약하게 해야 하는 종은 수중모터로부터 먼 곳이나 바위아래 쪽에 두어 수류를 피한다. 연산호류는 수류를 좋아하지만 증식을 위해 절단한 개체는 기질물질에 새로 부착하기 위해서는 평상시보다 약한 수류를 형성시켜 주어야 한다.

다섯째, 화학물질(chemicals)은 산호충류의 배양과 성장에 필수적이다. 수조는 천연바다와는 달리 폐쇄 시스템이기 때문에 하기와 같은 물질들을 주기적으로 공급해 주어야 한다.

- 요오드(I) : 산호충류의 성장에 필요

- 스트론튬(Sr) : 산호충류가 칼슘을 흡수하는 데 도움을 줌

- 몰리브덴(Mo) : 산호충류의 골격 형성과 체내 순환계에 필요

- 미량원소(Trace Element) : 산호충류의 대사과정에 필요

- 칼슘(Ca) : 산호충류가 골격을 형성하는 데 필요

본 발명에서는 산호충류의 성장과 생존을 위해서 여과기를 잠시 정지시키고, 칼슘, 요오드, 스트론튬, 미량원소, 비타민을 일주일에 2회씩 적정량을 넣어 준다.

여섯째, 섭식(feeding)은 모든 생물체들과 같이 산호충류도 살아가기 위하여 먹이를 섭취해야 한다. 산호충류를 위한 먹이에는 유기물질, 식물성 플랑크톤, 동물성 플랑크톤 등이 있다. 와편모충류를 가진 산호충류는 광을 주된 에너지 공급원으로 이용하며 먹이도 섭식 한다. 반면, 와편모충류와 공생 관계에 있지 않은 산호충류는 섭식에만 의존한다. 먹이를 줄 때는 산호충류들의 폴립 크기를 고려하여야 하며 공급 시 산호충류의 먹이 섭취를 돕기 위해서 프로테인 스키머(Protein skimmer)의 작동을 멈추어야 한다.

식물성 플랑크톤으로 주로 사용되는 것은 나노클로롭시스(Nanochloropsis), 테트라셀미스(Tetraselmis) 등이 있으며, 동물성 플랑크톤으로는 옆새우류(Copepoda), 윤형동물(Rotifer), 알테미어 등이 있고, 이들 동물성 플랑크톤과 비타민을 섞은 Korall fluid (JBL GmbH & Co. KG사) 제품 등이 먹이로 사용된다. 과다 투여된 먹이는 오염원이 될 수 있기 때문에 산호충류에 생 먹이와 액상 먹이를 줄 때는 수조의 크기와 개체수를 고려하여 적당량을 주어야 한다.

본 발명에서는 먹이로 식물성 플랑크톤인 나노클로롭시스(Nanochloropsis), 테트라셀미스(Tetraselmis), 동물성 플랑크톤인 Korall fluid (JBL사) 제품을 사용한다. 먹이는 하루에 두 번 여과기를 잠시 끄고 주도록 한다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

**[실시예] 뿌리형성과정을 포함한 연산호류의 대량 증식**

**1) 연산호류 뿌리형성과정의 최적조건 확인**

연산호류의 증식에서 문제가 되어왔던 부착단계에서 부착의 성공률을 높이기 위하여 뿌리형성과정(RLPs)을 촉진시키는 최적조건에 대한 실험을 수행하였다.

연산호류로 큰수지맨드라미, 밤수지맨드라미, 자색수지맨드라미, 분홍바다맨드라미에 대해 실험하였다.

산소공급을 위해서는 배양수조에 높이 7~10cm, 격자 구멍의 크기가 <0.5cm x 0.5cm인 플라스틱 바구니를 띄운 후, 바구니 안에 순응이 끝난 연산호류 가지를 넣었다(도 1 참조). 바구니는 부력에 의하여 산소를 다량 포함하고 있는 표층수 사이에 떠있게 되며, 수류를 직접 맞기 때문에 절단된 가지의 가스교환이 촉진되고 바이러스 감염이 최소화 되게 하였다.

① RLPs 촉진조건 : 온도

본 발명에서는 배양수(인공해수)의 온도를 13℃, 18℃, 23℃, 28℃로 하여 절단 후 7일 동안 배양하였으며, RLPs 형성 유무 및 소요되는 시간을 조사하여 RLPs 촉진시키는 최적의 온도를 조사하였다.

실험 결과, 절단 7일 경과 후에 23℃에서 RLPs 형성률이 90% 이상으로 나타난 반면(도 2 참조), 저온 조건인 13℃, 18℃에서는 각각 10%, 50% 이하로 나타났다. 고온 조건인 28℃에서는 온도 스트레스로 인하여 RLPs가 형성되기 이전에 실험개체의 치사율이 높게 나타났다.

따라서, 산호충류 절단 후 RLP 촉진에서 최적의 온도는 23℃ 임을 알 수 있었다.

② RLPs 촉진조건 : 산소공급

본 발명에서는 온도를 23℃ 로 유지시킨 배양수 2 리터에 산소공급을 조절하여 연산호류 절단 후 7일 동안 배양하였으며, RLPs 형성 유무 및 소요되는 시간을 조사하여 RLPs을 촉진시키는 산소공급 필요여부를 조사하였다.

배양수 2리터가 들어있는 수조에 자색수지맨드라미 가지를 놓고 산소공급 유무에 따른 RLPs 형성율을 조사하였다.

실험결과, 절단 7일 경과 후에 연속적으로 산소공급이 되는 수조의 자색수지맨드라미 가지에서는 RLPs 형성율이 90% 이상으로 나타난 반면, 산소공급이 없는 자색수지맨드라미 가지에서는 RLPs 형성율이 20% 이하로 나타났다.

따라서, 산호충류 절단 후 RLPs을 촉진시키는데는 연속적인 산소공급이 필요함을 알 수 있었다.

③ RLPs에 의한 기질에의 부착율 확인

배양수(인공해수)에 띄워진 바구니에 기질을 넣어 바구니를 수조 바닥으로 가라앉히고, 기질 위에 상기의 최적 조건에서 RLPs가 형성된 연산호류 가지를 올려놓았다.

부착시에 사용되는 기질은 칼슘을 다량 포함하고 있는 자연기질이 좋으며, 본 발명에서는 굴 껍데기와 다공성 현무암을 이용하였다.

또한, 부착을 원활하게 하기 위하여 수류를 약하게 하여 물리적인 충격을 최소화하여 배양하였다.

결과적으로, 상기와 같이 RLPs가 형성된 개체는 24시간 내에 기질에 100% 부착하는 것으로 나타났다.

따라서, RLPs 촉진의 최적의 조건(온도 22~25℃ 및 연속적인 산소공급)으로 조절하여 RLPs 형성율을 최대화함으로써 기질에 부착율도 최대화가 될 수 있으며, 산호충류의 대량증식에 효율을 높일 수 있다.

2) 기존의 대량증식방법과 본원 대량증식방법의 생존율 비교

기존의 국내특허공개공보 제10-2005-3508호의 산호충류의 대량증식방법에 의한 부착율과 본원발명의 RLPs를 이용한 대량증식방법에 의한 생존율을 비교하였다.

제주도 서귀포 일대의 연산호류의 모 군체로부터 스테인레스재질의 날카로운 가위를 이용하여 연산호류의 가지를 3~5 cm 정도의 크기로 60개체를 채집하였다. 채집한 가지들은 16~18℃의 해수에 에어펌프로 산소와 수류를 공급하는 수조에 넣고 18~20 시간 동안 두어 절단면의 점액질을 제거하면서 절단면을 치유하였다.

이렇게 치유된 가지들을 자연해수가 들어있는 이중 비닐 주머니에 넣고, 해수량의 5배 정도로 100% 산소를 채운 후 비닐을 고무줄로 묶어 산소가 새어나가지 않도록 봉했다. 다시 한번 큰 비닐봉투에 넣어 봉하고, 이를 아이스박스에 넣어 운송하였다.

실험실로 운송된 후, 채집된 연산호류 가지는 비닐봉투 채로 배양수조의 22~25 ℃의 물에 넣어 30분간 순응시켰다. 온도 적응 후에 비닐에서 채집된 가지들을 꺼내어 자연해수와 배양수(인공해수)를 1:1로 섞은 수조에 30분간 순응시켰다.

이 다음, 순응된 연산호류 가지에 뿌리형성과정을 수행하였다.

산소공급을 위해서는 배양수조에 높이 7~10 cm, 격자 구멍의 크기가 < 0.5x0.5 cm인 플라스틱 바구니를 띄운 후, 바구니 안에 순응이 끝난 연산호류 가지들을 넣었다. 바구니는 부력에 의하여 산소를 다량 포함하고 있는 표층수 사이에 떠있게 되며, 수류를 직접 맞기 때문에 절단된 가지의 가스교환이 촉진되고 바이러스 감염이 최소화 되게 하였다. 배양수(인공해수)의 온도는 23℃ 로 유지시켰으며,지속적으로 산소를 공급하면서 7일동안 RLPs 형성과정을 조사하였다.

연산호류 절단 후 7일 정도 경과 시에 RLPs 가 완전히 형성되었고 이를 다공성 현무암에 부착시켰다. 접착제는 사용하지 않았고, 부착된 산호충류에 물리적 충격을 가하지 않기 위해 수조내의 수류를 약하게 하였다.

기질에 부착시킨 연산호류 가지들을 베를린 방식으로 대형 프로테인 스키머와 펌프를 설치한 배양수조에서 22~23 ℃ 의 수온을 유지시키며, 수류 및 산소를 공급하면서 배양하였다.

그 결과, 기존의 대량증식방법에 의한 7일 경과후의 부착율은 23%로 나타난 반면, 본 발명의 RLPs 형성에 의한 부착율은 100%로 나타나 월등히 본원 발명의 부착율이 높은 것을 알 수 있었다. 또한, 이에 따른 생존율도 차이가 있어 실험 진행 한 달 후에는 기존의 대량증식 방법에 의한 생존율은 46% 인 반면, 본 발명의 대량증식방법에 의한 생존율은 100% 로, 월등히 본원발명의 생존율이 높음을 알 수 있었다.

따라서, 본원발명의 연산호류 대량증식방법은 RLPs를 촉진시켜 부착율 및 생존율을 최대화시킴으로써, 산호충류의 대량증식에 효율을 높일 수 있다.

## 발명의 효과

본 발명의 연산호류 대량증식방법은 기질부착 전단계에서 RLPs 촉진의 최적의 조건(온도 및 산소공급)으로 조절하여 RLPs 형성율을 최대화함으로써 기질에 부착율 및 생존율도 최대화가 될 수 있으며, 산호충류 대량증식에 효율을 높이는 작용효과를 나타낸다.

따라서, 본 발명의 대량 증식 방법은 한국산 산호자원을 대량 증식시켜, 종 보전 및 생태계 복원은 물론, 신물질 연구나 유전학적 연구 등을 위한 종 확보 수단으로 직접 사용될 수 있으며, 관상용 해양 수조 사업의 내수와 수출로 경제성이 증대되는 효과를 가져다준다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은 큰수지맨드라미와 자색수지맨드라미에서 뿌리형성과정(root-like processes, RLPs)이 된 것을 나타낸 도이다.

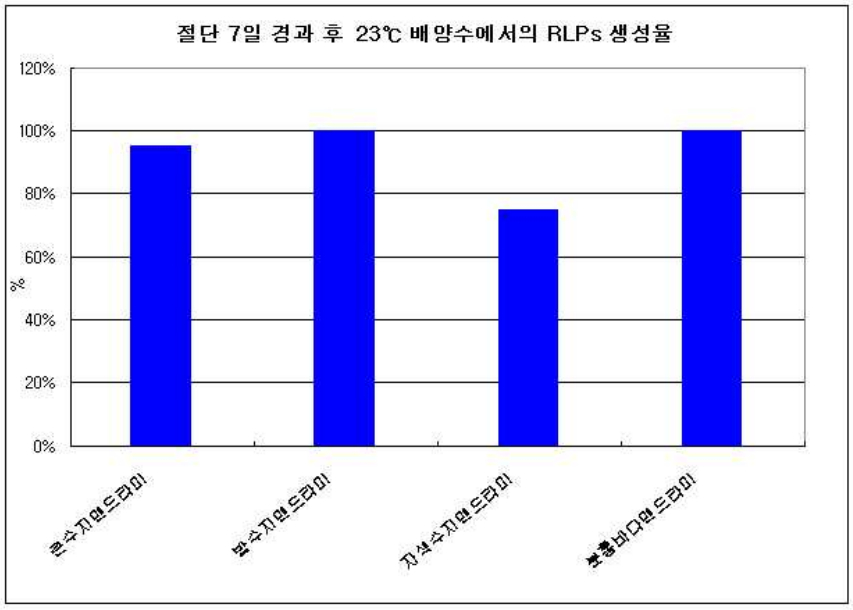
도 2는 23℃에서의 연산호류의 RLPs의 생성율을 나타낸 도이다.

도면

도면1


큰수지맨드라미
자색수지맨드라미

도면2


절단 7일 경과 후 23℃ 배양수에서의 RLPs 생성율
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
%
큰수지맨드라미
보수지맨드라미
자색수지맨드라미
보통비단맨드라미