(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0056395
(43) 공개일자 2008년06월23일

(51) Int. Cl.
A01H 1/00 (2006.01) *A01H 1/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0129240
(22) 출원일자 2006년12월18일
심사청구일자 2006년12월18일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교내
(72) 발명자
전종성
경기 안양시 동안구 평촌동 인덕원 대우 아파트 115동 1004호
안진흥
경북 포항시 남구 지곡동 포항공대 교수아파트 9동 1803호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

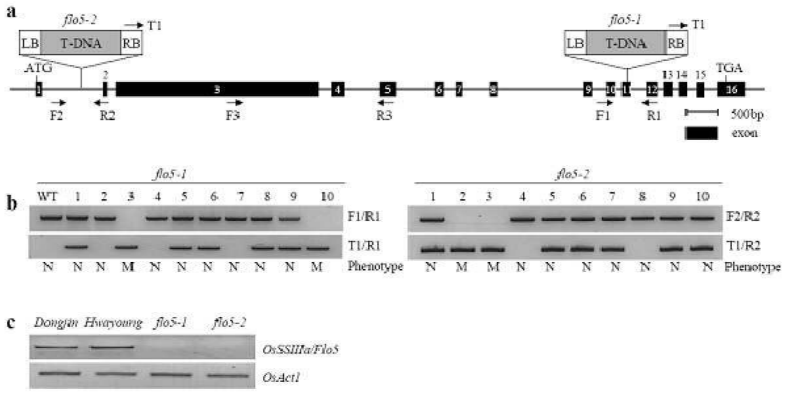
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 동진벼 전분합성효소 기능상실을 이용한 쌀 배유의 전분특성 변형

(57) 요 약

본 발명은 자포니카 품종인 동진벼의 전분합성효소 유전자 *OsSSIIIa*에 T-DNA를 삽입한 기능상실 돌연변이체 *OsSSIIIa/Flo5-1*를 이용하여, 야생형에 비해 쌀 배유의 전분결정성이 감소되며, 전분 중합도(DP) 6~8, 16~20 및 30 이상의 전분 사슬은 감소하고 DP 9~15 및 22~29는 증가하며, 호화개시온도가 1~5℃ 감소되는 것을 특징으로 하는 배유의 전분과립이 작고 둥글며 느슨한 구조로 형성된 쌀을 제조하는 방법에 관한 것으로, 이런 쌀은 지방질 등이 있는 외층분리가 용이하여 청주 등을 만들 때 적합하며 열처리를 통한 가공에 에너지 절약 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

류나연

경기 수원시 영통구 영통동 벽적골 9단지 롯데아파트 944동1102호

부성희

경기 용인시 기흥구 보라동 민속마을 쌍용아파트 109동 1003호

한태룡

경기 용인시 수지구 상현동 금호베스트빌 251동 1803호

특허청구의 범위

청구항 1

자포니카(japonica) 품종인 동진벼의 전분합성효소 유전자 *OsSSⅢa*에 T-DNA를 삽입한 기능상실 돌연변이체 *OsSSⅢa/Flo5-1*를 이용하여, 야생형 보다 배유의 전분과립이 작고 둥글며 느슨한 구조로 형성된 쌀을 제조하는 방법.

청구항 2

자포니카(japonica) 품종인 동진벼의 전분합성효소 유전자 *OsSSⅢa*에 T-DNA를 삽입한 기능상실 돌연변이체 *OsSSⅢa/Flo5-1*를 이용하여, 야생형 보다 배유의 전분결정성이 감소되며, 전분 중합도(DP) 6~8, 16~20 및 30 이상의 전분 사슬은 감소하고 DP 9~15 및 22~29는 증가하며, 호화개시온도가 1~5℃ 감소되는 것을 특징으로 하는 배유의 전분과립이 작고 둥글며 느슨한 구조로 형성된 쌀을 제조하는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항의 방법에 의하여 제조되는 것을 특징으로 하는 가공적성이 증진된 쌀.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6> 본 발명은 자포니카 품종인 동진벼의 전분합성효소 유전자 *OsSSⅢa*에 T-DNA를 삽입한 기능상실 돌연변이체 *OsSSⅢa/Flo5-1*를 이용하여, 야생형에 비해 쌀 배유의 전분결정성이 감소되며, 전분 중합도(DP) 6~8, 16~20 및 30 이상의 전분 사슬은 감소하고 DP 9~15 및 22~29는 증가하며, 호화개시온도가 1~5℃ 감소되는 것을 특징으로 하는 배유의 전분과립이 작고 둥글며 느슨한 구조로 형성된 쌀을 제조하는 방법에 관한 것으로, 이런 쌀은 지방질 등이 있는 외층분리가 용이하여 청주 등을 만들 때 적합하며 열처리를 통한 가공에 에너지 절약 효과가 있다.

<7> 전분(starch)은 쌀, 옥수수 및 감자를 포함하는 많은 식물에서 중요한 저장성 다당류이며, 일반적으로 D-글루코스 동종중합체(D-glucose homopolymers)인 아밀로오스(amylose)와 아밀로펙틴(amylopectin)으로 구성된다. 아밀로오스는 선형 α-1,4 글루칸 쇄로 이루어지며, 아밀로펙틴은 α-1,6 결합에 의해 연결된 선형 α-1,4 글루칸 쇄로 이루어진 분지된 분자이다. 아밀로펙틴의 구조는 전분 입자의 결정구성(crystalline organization)에 기여하고 좋은 아밀로펙틴 클러스터들은 종자(seed)의 가장 큰 부분을 이루는 알맞은 배유(endosperm) 전분을 형성하는데 기여한다.

<8> 곡물의 배유에서 전분의 합성은 AGPase(ADP glucose pyrophosphorylase), 전분 합성효소(starch synthase, SS), 전분가지화효소(starch branching enzyme, BE) 및 전분비가지화효소(starch debranching enzyme, DBE)가 연관되어 합동적인 일련의 효소 반응으로 이루어진다.

<9> 전분합성효소(SS)는 글루칸 사슬의 비환원 말단(non-reducing end)에서 ADP 글루코스(ADPGlc)의 글루코실 유닛(glucosyl unit) 전이를 촉매함으로써 선형 글루칸 사슬을 합성한다. 가지화효소(BE)는 폴리글루칸(polyglucan) 사슬에서 α-1,6 glucosidic 결합의 형성을 촉매하는 유일한 효소이며, 비가지화효소(DBE)는

<10> 폴리글루칸의 α-1,6 glucosidic 결합을 가수분해하는 것으로 알려져 있다.

<11> 고등식물에서는 5개의 전분합성효소, 1개의 GBSS(granule-bound starch synthase)와 4개의 가용성(soluble) 전분합성효소가 동정되어있다. GBSS는 아밀로오스 사슬을 합성하며, GBSSI은 저장 조직에서, GBSSII는 비저장 조직에서의 아밀로오스 합성에 관여한다. 많은 연구에서 고등식물의 가용성 전분합성 효소는 네 가지 그룹의 형태(SSI 에서 SSIV)를 가지며 각각 여러 동형체(isoforms)를 가진다고 보고되어 있는데, 그 중 벼(*Oryza sativa*)에서는 OsSSI, SSⅡs(OsSSⅡa, OsSSⅡb, OsSSⅡc), SSⅢs(OsSSⅢa, OsSSⅢb) 및 SSIV(OsSSIVa, OsSSIVb)으로 8개의 동형체들이 보고되어 있다. 대부분의 OsSS 동형체들은 배유에서 발견되었으며, 이들은 종자 발달에 있어 유전자 발현 패턴을 바탕으로 초기(early), 후기(late) 및 모든시기(steady) expressers의 세 그룹으로

나뉜다. 벼 종자 배유에서 발달 진행은 전저장기(pre-storage)와 전분필링기(starch filling phase)로 구성된다.

<12> OsSSⅡb 및 OsSSⅢb 는 early expresser에 속하고, 수정 후(DAF) 1~5일사이의 종자 배유 발달의 전저장기에서 주된 기능을 가지는 것으로 예상된다. OsSSⅡa와 OsSSⅢa 는 late expresser에 속하며, 수정 5일후 전분필링기에 풍부하나 전저장기동안에도 드물게 발현되며, 종자 배유에서 전분합성에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. *OsSSI*, *OsSSⅡc*, *OsSSIVa* 및 *OsSSIVb* 는 배유 발달 동안 비교적 일정하게 존재한다. 이는 전분합성효소 동형체들이 벼 배유 발달에서 전분 합성에 개별적으로 관여하는 것이다.

<13> 이러한 벼의 가용성 전분합성효소 동형체들의 역할은 기능상실 돌연변이, 기능부여 형질전환 식물체 또는 다른 많은 재배종(cultivar)에서 전분합성효소 활성과 전분구조의 관계 규명으로 밝혀지고 있다. OsSSI의 기능은 Tos17 삽입 돌연변이를 통하여 아밀로펙틴의 분지점으로부터 나오는 중합도(degrees of polymerization)가 6-7의 짧은 사슬에서 8-12의 사슬로의 합성이 결여됨을 확인하였다. 이때 SSI 돌연변이는 종자와 전분입자의 크기, 모양 및 배유 전분의 결정도(crystallinity)에는 영향을 주지 않아 다른 전분합성효소들이 부분적으로 SSⅠ기능의 손실을 보완한 것으로 보인다(Fujita et al., Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice, 2006, *Plant Physiol.*, 140:1070-1084). OsSSⅡa는 알칼리 붕괴도(*alk* 유전자)와 호화도(*ge1* 유전자)에 관여하는 유전자와 일치하는 것으로 알려져 있고(Nakamura et al., Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice varieties, 2005, *Plant Mol. Biol.*, 58:213-227), 이전 연구에서 그 역할은 중합도(DP)가 6-11에서 13-28로의 합성에 관여하고, 그 활성이 인디카 벼에 비하여 자포니카 벼에서는 감소하는 것으로 보고되고 있다. OsSSⅢa 는 배유 발달의 전분필링기 동안에 강하게 발현하고 전분합성에 중요한 역할을 하는 것으로 보이며, 이전의 연구에서 *SSⅢ* 돌연변이의 분석은 옥수수의 *dull-1*, 애기장대의 *Atss3-1* 및 *Atss3-2* 에서처럼 아밀로펙틴 B_2(중합도 25-36), B_3,B_4(중합도 37)의 긴 사슬을 합성하는 것으로 추측되고 있다.

<14> 무디고(dull), 가루모양의(floury), 점착성의(glutinous) 배유와 같이 윤기가 나지 않는 불투명한(opaque) 배유 돌연변이의 연구는 전분합성 효소를 암호화하는 유전자를 규명하는데 유용하였는데, 가지화효소인 BEⅡb의 결실을 가지는 아밀로오스-익스텐더(*amylose-extender*, *ae*) 돌연변이의 연구는 배유에서 아밀로펙틴의 짧은 사슬의 전이에 관여하는 특이 효소의 역할을 알아내는데 도움이 되었다. 벼에서 가루모양(floury)의 배유(*flo*)의 표현형(phenotype)은 전분입자 형태에 관련되어 있고, *flo1* 좌(locus)는 둥글고 느슨한 전분입자를 포함하는 백색 가루모양(floury-white)의 배유를 가져오는 것으로 알려져 있다. *Flo2*는 히스티딘을 증가시키고 높은 리신(lysine) 함량과 전분합성 유전자의 발현 조절에 관여하는 돌연변이로 밝혀졌다. 또한 *Flo4* 돌연변이는 PPDK(pyruvate orthophosphate dikinase)를 암호하는 *OsPPDKB* 유전자의 이상으로 느슨한 전분 입자를 가지는 비정상적인 배유를 가지는 것으로 나타났다.

<15> 본 발명은 이러한 벼의 가용성 전분합성효소 동형체들의 역할에 관련된 연구를 진행하던 중, OsSSⅢa의 유전자에 T-DNA를 삽입하여 OsSSⅢa 기능상실 돌연변이를 분리하고 분석하였으며, 백색 가루 형태의 배유(floury white-core endosperm) 표현형을 지녀 가공 적성을 높인 새로운 형태의 쌀(*flo5-1*)을 발명하고자 하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<16> 따라서 본 발명의 목적은 자포니카 품종인 동진벼의 전분합성효소 유전자 *OsSSⅢa*에 T-DNA를 삽입한 기능상실 돌연변이체 *OsSSⅢa/Flo5-1*를 이용하여, 배유 전분의 아밀로펙틴의 사슬 길이 분포와 물리화학적인 특성을 조사하여 벼 배유 발달에서 아밀로펙틴 합성시 *OsSSIIIa/Flo5-1*의 기능을 억제한 야생형에 비해 쌀 배유의 전분과립이 작고 둥글며 느슨한 구조로 형성된 쌀을 제조하는 방법 및 그로 인한 쌀 가공단계에서 효율성이 높은 새로운 품종의 쌀을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

<17> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 자포니카(japonica) 품종인 동진벼의 전분합성효소 유전자 *OsSSⅢa*에 T-DNA를 삽입한 기능상실 돌연변이체 *OsSSⅢa/Flo5-1*를 이용하여, 야생형 보다 배유의 전분과립이 작고 둥글며 느슨한 구조로 형성된 쌀을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<18> 보다 자세하게는, 자포니카(japonica) 품종인 동진벼의 전분합성효소 유전자 *OsSSⅢa*에 T-DNA를 삽입한 기능상실 돌연변이체 *OsSSⅢa/Flo5-1*를 이용하여, 야생형 보다 배유의 전분결정성이 감소되며, 전분 중합도(DP) 6~8, 16~20 및 30 이상의 전분 사슬은 감소하고 DP 9~15 및 22~29는 증가하며, 호화개시온도가 1~5℃ 감소되는 것을

특징으로 하는 배유의 전분과립이 작고 둥글며 느슨한 구조로 형성된 쌀을 제조하는 방법을 제공한다.

<19> 이하 본 발명의 내용을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 한정되는 것으로 해석돼서는 안 될 것이다.

<20> **<실시예 1. *OsSSIIIa/Flo5-1* 돌연변이>**

<21> 자포니카(japonica) 품종인 동진의 돌연변이(mutant) flo5-1를 이용하였으며, 전분(Starch)은 충분히 익은 종자에서 추출하였고, 필요에 따라 익어가는 종자를 수집하여 -80℃에 저장하여 이용하였다.

<22> 돌연변이 풀(Mutant pool)을 만들기 위해 pGA2715와 pGA2772가 사용되었으며, 이들 모두 T-DNA에 35S 인헨서(enhancer)를 포함하며, 활성 돌연변이체를 만드는 운반체이며, pGA2772는 pGA2715를 변형한 것으로 pUC18 벡터를 근간으로 한다. OsSSIIIa 유전자는 16개의 엑손(exon)과 15개의 인트론(intron)으로 구성되며, *flo5-1* 는 *OsSSIIIa* 유전자의 11번 엑손(exon)에 pGA2715 T-DNA가 삽입된 돌연변이이다(도 1a). 이들은 floury(flo) white-core endosperm 표현형을 나타내고, 이하 실시예에서는 OsSSIIIa/Flo5-1로 표기한다.

<23> *OsSSIIIa* 돌연변이인 *flo5-1*는 벼 T-DNA 삽입 염기서열 데이타베이스를 통하여 분리하였다(RISD; Jeon et al. 2000; Jeong et al. 2002; An et al. 2003; Jeong et al. 2006; http://141.223.132.44/pfg/index.php). 돌연변이는 PCR로 분리하였으며, 유전자 특이 프라이머 조합(F1/R1 and F2/R2)과, T-DNA와 유전자 특이 프라이머 조합(T1/R1 and T1/R2)의 방법으로 분리하였다(도 1b). T2, T3개체의 분석을 통해 이들 돌연변이는 가루모양의 배유(floury endosperm) 표현형을 나타내는 것을 확인하였고, 이를 통해 열성유전을 확인하였다.

<24> T-DNA-특이 프라이머 T1: 5'-ATCCAGACTGAATGCCCACA-3'(서열번호 1)

<25> *OsSSIIIa* 유전자 특이 프라이머 F1: 5'-TGAAAACTTCCAAGTCCAAAATCAGT-3'

<26> (서열번호 2)

<27> R1: 5'-GCATCTGACATAGGATGAAATAAGCAAAA-3' (서열번호 3)

<28> F2: 5'-GTTTTGATTCATTTCATCTTGGGAACATA -3' (서열번호 4)

<29> R2: 5'-TTTACGAAGCTATCCTACACAAACCTGAA-3' (서열번호 5)

<30> **<실시예 2. RT-PCR 분석>**

<31> 전체 RNA는 트리졸(Trizol)을 사용하여 미성숙 종자에서 RNA를 추출하여 준비하였다. DNase를 처리한 RNA를 올리고-dT 프라이머를 이용하여 역전사효소(reverse-transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 OsAct1에 대해 유전자 특이 프라이머로 정량하여 이용하였다. OsSSIIIa의 RT-PCR을 위한 유전자 특이 프라이머는 게놈 오염을 확인할 수 있도록 3번째와 4번째 인트론을 포함하여 제작하였다. RT-PCR 반응은 94℃에서 5분, 94℃에서 1분, 56℃에서 1분, 72℃에서 1분을 28~35회 반복하였으며 72℃에서 5분간 수행하였다.

<32> F3: 5'- CATGAAGTTGATGTAATCTCTTTG-3' (서열번호 6)

<33> R3: 5'- TCTCATAGTCTTTTCCTTCATCTC-3' (서열번호 7)

<34> OsAct1: 5'- GGAACTGGATAGGTCAAGGC -3' (서열번호 8)

<35> 5'- AGTCTCATGGATACCCGCAG -3' (서열번호 9)

<36> 돌연변이는 종자를 제외한 다른 조직에서는 특이한 성장의 차이나 표현형의 차이가 나타나지 않았으며 이는 RT-PCR 결과를 통해서 볼 때 다른 조직에서의 적은 발현과 종자에서의 많은 발현을 통한 결과로 종자에서의 역할이 크다는 사실과 일치한다는 것을 알 수 있었다. 또한 돌연변이의 미성숙 종자의 RNA를 통해 야생형(동진벼, 화영벼)과 비교해볼 때 전사의 발현이 나타나지 않아 정확하게 유전자의 기능상실을 확인할 수 있었다(도 1c).

<37> **<실시예 3. 전분 함량 측정>**

<38> 전분 함량 측정은 에탄올-물 추출방법(Lee at al. 2005)과 비가용성 분광광도법(Jelitto et al. 1992)으로 측정하였다. 돌연변이에서 전분 함량이 변화된 것을 여러 조직에서 확인하였으나 두드러진 차이를 확인할 수 없었다. 껍질을 벗긴 쌀 낟알의 중심의 부분은 flo5-1가 백색 가루모양의 배유(floury white-core endosperm)를 보이며(도 2b, d), 대조구의 배유는 투명하게 보인다(도2 a.c). 이것은 *OsSSIIIa/Flo5-1*의 기능 상실의 결과로 발

생하는 전분 합성에 문제가 생긴 것에 의해 나타난 것이라고 예상한다. 낟알 무게에는 flo5 돌연변이와 야생형 간에 큰 변화가 없었다.

<39> **<실시예 4. 주사전자현미경 분석>**

<40> 배유의 비가용성 전분은 동형질의 돌연변이를 백미로 만든 후, 0.1%의 수산화나트륨(NaOH)에 반복적으로 담가서 씻는 방법(alkali steeping method)으로 분리하였다. 그 후, 실온에서 건조시키고 100 메쉬(mesh) 체에 걸러 실험에 이용하였다. 분리된 전분 가루는 주사전자현미경으로 관찰하였고, X-ray 회절 패턴과 사슬 길이 측정에도 사용되었다.

<41> 껍질을 벗긴 쌀은 현미경 분석을 통해 floury endosperm 표현형을 찾았다. 주사전자현며경(SEM) 분석은 Fujita(2003) 방법에 따라서 수행되었는데, 금으로 코팅하여 Stereoscan Leica Model 440(Leica Cambridge사)으로 SEM측정을 하였다.

<42> 중심부의 전분의 구조를 SEM을 통해 확인했을 때 전체 종자의 단면이 변형된 것을 확인할 수 있었고, 전분 복합체가 느슨하게 구성(loosely packing)된 것을 확인할 수 있으며, 각각의 전분 과립(starch granule)은 야생형에 비해 작고 둥근 형태를 띠고 있다는 것을 확인할 수 있다(도 3).

<43> **<실시예 5. X-ray 회절 측정>**

<44> X-ray 회절 패턴(X-ray diffraction pattern)은 X-ray 회절계(diffractometer)를 사용하여 확인하였다(1.542Å, Cu-Kα, 40kV와 300mA). 전분은 3°/분 (0.02° step)의 스캐닝 비율로 2Θ의 회절각으로 4° 에서 40° 까지 스캐닝하였고, 전분 결정도는 Komiya and Nara (1986)방법으로 정량적으로 추정되었다.

<45> 전분은 비결정(amorphous) 및 결정(crystalline)을 띤 구조를 포함하는 부분 결정형의(semi-crystalline) 생체고분자(biopolymer)이다. X-ray로 확인한 결과, 대조구와 *flo5*돌연변이의 배유 전분은 15.06, 17.16, 17.94 와 23.00에서 4개의 피크(peak)를 가지는 전형적인 A 형태 결정 패턴을 보인다. *flo5-1*는 대조구에 비해 피크(peak)의 높이가 감소하였고 결정도 줄어든 것을 확인하였다(도 4, 표 1). 이는 *OsSSIIIa/Flo5-1* 유전자의 기능 결실은 전분 결정 형태의 변화가 아니라 전분 결정의 구조의 손상을 야기하는 것이다.

<46> [표 1] 배유 전분의 결정 비교

<47>

유전형	Relative crystallinity (%)[a]	Relative crystallinity ratio (%)
동진벼	10.14	100
화영벼	9.34	100
flo5-1	8.14	80.3
flo5-2	5.63	60.3

<48> [a]Relative crystallinity (%) = Ic (Ia + Ic) x 100, Ia = amorphous area on the X-ray diffractogram, Ic = crystallized area on the diffractogram

<49>

<50> **<실시예 6. 배유에서 폴리글루칸의 사슬 길이 분포>**

<51> 성숙한 배유로부터 추출된 전분은 이전의 보고 논문에 따라 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC) 방법(Kubo et al. 1999; Kang et al. 2003)으로 측정하였다. HPAEC-PAD (HPAEC equipped with a pulsed amperometric detector)에 의해 사슬 길이 분포를 측정하기 위해 전분(1 mg/mℓ)을 녹인 후 60분 동안 끓여서 식히고, 600mM 아세트산나트륨 버퍼(pH 4.4) 50㎕, 2% 아지드화나트륨(NaN_3) 10㎕를 넣은 후 비가지화를 위해 700U의 이소아밀라제(isoamylase)를 넣어 37℃에서 24시간 동안 반응시킨 후, 실온에서 침전물을 말렸다. 말린 침전물은 1M 수산화나트륨 60㎕를 넣고 녹인 후 450㎕의 물을 넣어 희석하고 25㎕를 반응에 사용하였다. 이때 CarboPac PA-1 컬럼(4 mm x 25 cm)이 장착된 BioLC (DX-500, Dionex, Sunnyvale)를 이용하여 PAD(pulsed amperometric detector)방법으로 측정하였다. 이때 α-1,4-글루칸의 크기 분류는 1 mℓ/min의 흐름 비율에 0.1 M 수산화나트륨에 아세트산나트륨(50~500 mM)의 농도 구배를 통해 측정하였다.

<52> *flo5-1* 돌연변이의 전분 사슬의 분포 변화를 보면 중합도가 30인 사슬이 감소하였으며, 이는 SSⅢa가 아밀로펙틴 B_2, B_3 및 B_4 같은 긴 사슬의 합성에 중요한 역할을 할 것이라 판단되며, 중합도가 9-15, 22-29인 사슬은 증가

하였고 6-8, 16-20인 사슬은 감소하였는데, 이는 다른 전분합성효소 동형체들의 변화된 활성으로 인하여 *flo5-1* 돌연변이에서 아밀로펙틴의 짧은 사슬에 변화가 이루어진 것으로 보인다(도 5).

<53> **<실시예 7. 전분의 온도 특성>**

<54> 분리된 전분의 호화도 특성은 Atichokudomchai의 방법을 사용하여 Calorimetry (DSC-650)로 측정하였다. 전분은 60% 수분 함유량으로 물을 섞은 후 알루미늄 팬에 옮겨서 밀봉하고 1시간동안 수분평형상태를 유지하도록 두었다가 25℃~130℃의 범위내에서 5℃/분 간격으로 가열하였다. 그리고 호화 개시온도(To), 최고온도(Tp), 종결온도(Tc) 및 호화 엔탈피ΔH(crystal melting enthalpy)를 DSC thermogram을 이용하여 확인하였다.

<55> [표 2] 배유 전분의 온도 특성

<56>

유전형	호화 개시온도 (To)	호화 최고 온도 (Tp)	호화 종결 온도 (Tc)	ΔT	ΔH
동진벼	57.3±0.3*	65.1±0.3	80.7±1.7	23.5±1.5	5.5±0.8
화영벼	55.5±1.6	64.2±0.1	81.5±1.3	26.0±2.6	6.1±2.2
flo5-1	53.6±0.3	60.0±1.1	81.3±0.6	27.8±1.3	5.9±1.8
flo5-2	54.1±0.6	61.1±0.4	82.1±1.6	28.0±1.9	5.6±0.4

<57> *flo5-1* 돌연변이에서 호화 개시 온도가 대조구보다 1~5℃ 감소하였으며 이것은 전분의 구조 변화와 결정 부위의 감소로 인하여 호화 온도가 감소한 것을 나타낸다. 또한 대조구보다 온도 변화의 폭(ΔT)도 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(표 2).

발명의 효과

<58> 본 발명은 자포니카 품종인 동진벼의 전분합성효소 유전자 *OsSSⅢa*에 T-DNA를 삽입한 기능상실 돌연변이체 *OsSSⅢa/Flo5-1*를 이용하여, 야생형에 비해 쌀 배유의 전분과립 구조를 변형하는 것에 관한 것이다. 구체적으로, 야생형에 비해 쌀 배유의 전분결정성이 감소되며, 전분 중합도(DP) 6~8, 16~20 및 30 이상의 전분 사슬은 감소하고 DP 9~15 및 22~29는 증가하며, 호화개시온도가 1~5℃ 감소되는 것을 특징으로 하는 배유의 전분과립이 작고 둥글며 느슨한 구조로 형성된 쌀을 제조하여, 이런 쌀은 지방질 등이 있는 외층분리가 용이하여 청주 등의 주류를 제조할 때나 열처리가 필요한 쌀 가공식품에서 가공공정을 편리하게 하고 에너지 절약 효과가 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1a는 두 개의 *flo5-1* 돌연변이 대립유전자에서 T-DNA가 삽입된 위치를 나타내는 모식도이고, 도 1b 및 1c는 이들 돌연변이를 특이 프라이머로 PCR하여 분리하여 확인한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

<2> 도 2는 *flo5-1* 돌연변이에서 종자 배유의 형태를 나타내는 사진(b,d) 및 그들의 야생형 대조구(a,c)를 나타내는 사진이다.

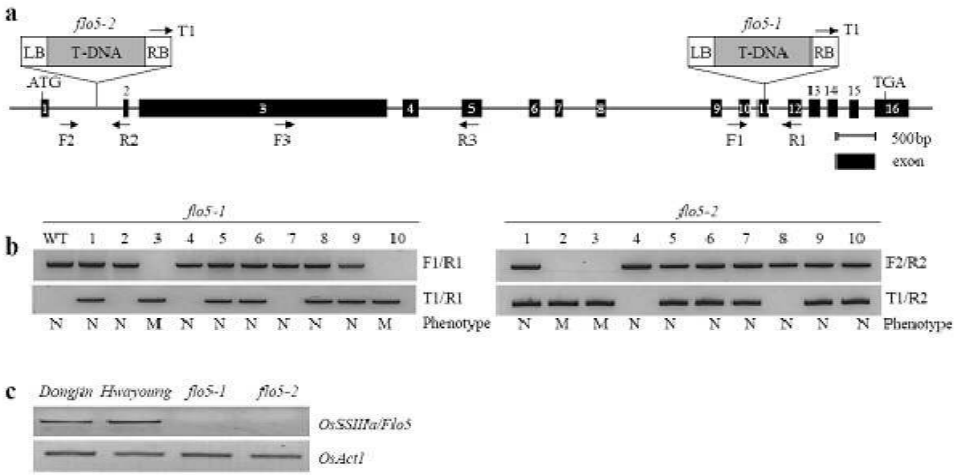
<3> 도 3은 *flo5-1* 및 동진벼의 배유와 배유 전분과립을 나타내는 주사전자현미경(SEM) 사진이다.

<4> 도 4는 *flo5-1* 돌연변이 및 동진벼로부터 분리한 배유의 전분과립의 X-ray 회절 패턴을 나타내는 그래프이다.

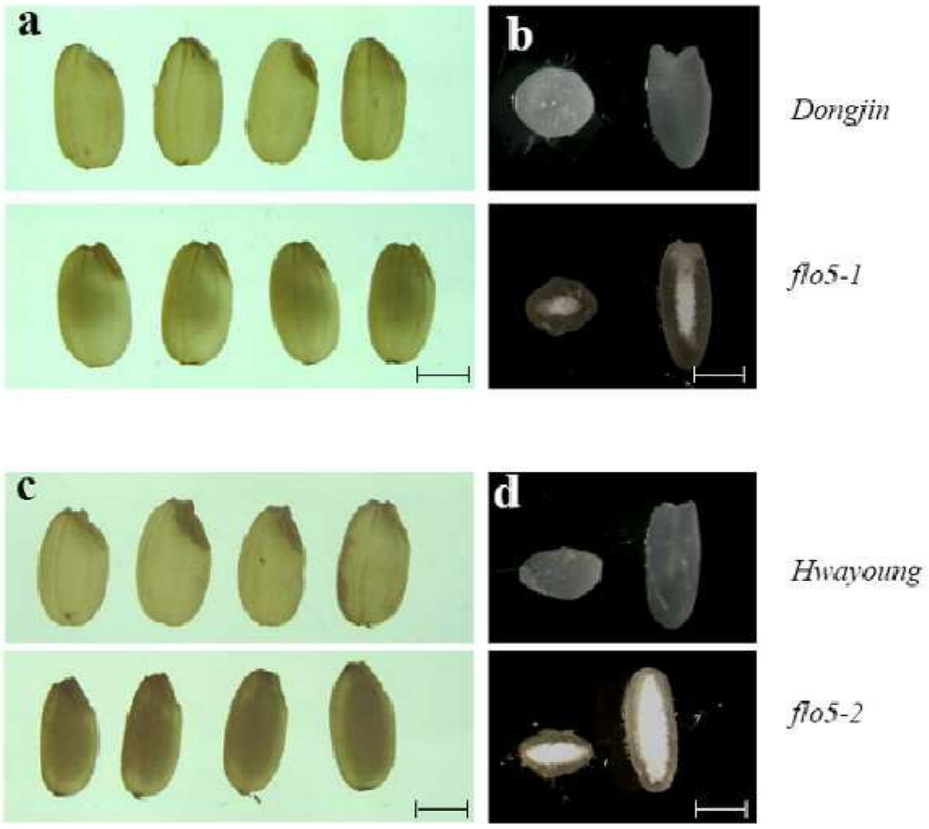
<5> 도 5는 *flo5-1* 및 동진벼의 배유에서 분리한 아밀로펙틴의 사슬 길이 정도를 나타내는 그래프이다.

도면

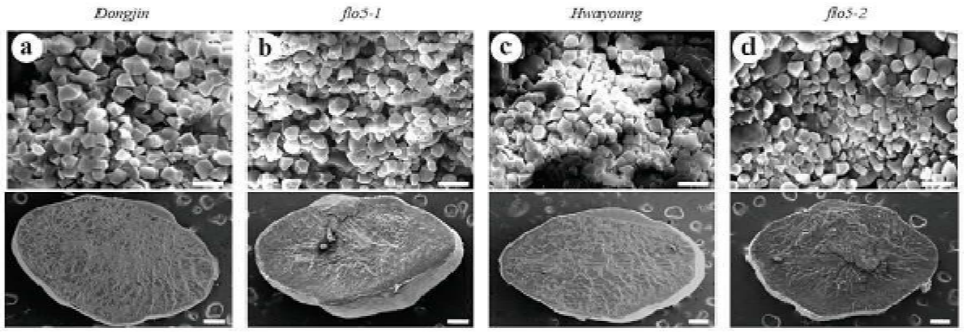
도면1


a
flo5-2
T1
LB
T-DNA
RB
ATG
TGA
F2
R2
F3
R3
flo5-1
F1
R1
500bp
exon
b
flo5-1
flo5-2
WT 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
F1/R1
T1/R1
F2/R2
T1/R2
N N N M N N N N N N M
N M M N N N N N N N
Phenotype
c
Dongjin Hwayoung flo5-1 flo5-2
OsSSIIIa/Flo5
OsAct1

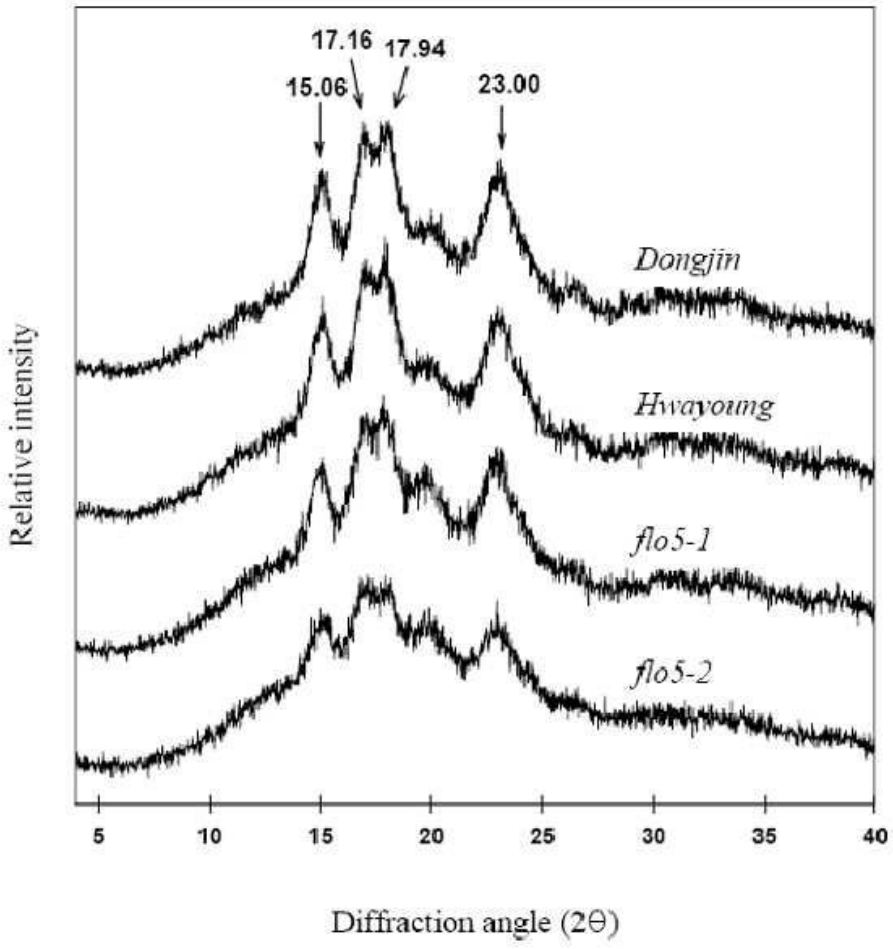
도면2


a
b
Dongjin
flo5-1
c
d
Hwayoung
flo5-2

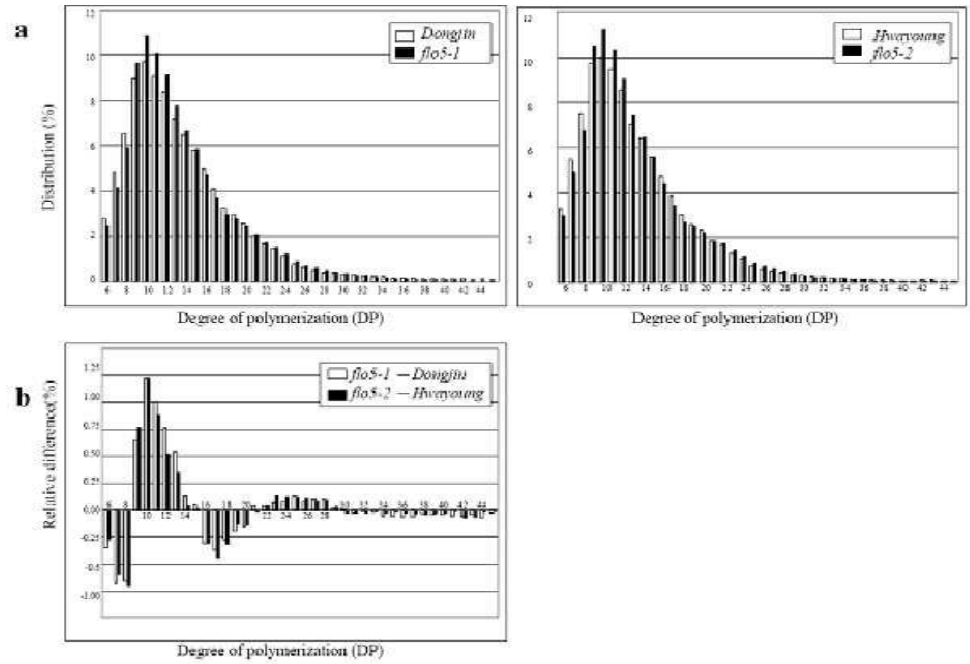
도면3


Dongjin
flo5-1
Hwayoung
flo5-2
a
b
c
d

도면4


17.16
17.94
15.06
23.00
Dongjin
Hwayoung
flo5-1
flo5-2
Relative intensity
5
10
15
20
25
30
35
40
Diffraction angle (2θ)

도면5



서열목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University
POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION
<120> Modification of Endosperm Starch Property by Loss of Function of Starch Synthase in Dongjin rice

<160> 9

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> T-DNA-specific primer TI

<400> 1
atccagactg aatgcccaca 20

<210> 2
<211> 26

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsSSllla gene specific primer F1

<400> 2
tgaaaacttc caagtccaaa atcagt 26

<210> 3
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsSSllla gene specific primer R1

<400> 3
gcatctgaca taggatgaaa taagcaaaa 29

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsSSllla gene specific primer F2

<400> 4
gttttgattc atttcatctt gggaacata 29

<210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsSSllla gene specific primer R2

<400> 5
tttacgaagc tatcctacac aaacctgaa 29

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsSSllla gene specific primer F3

<400> 6
catgaagttg atgtaatctc tttg 24

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsSSllla gene specific primer R3

<400> 7
tctcatagtc ttttccttca tctc 24

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsAct1 gene speicific primer

<400> 8
ggaactggat aggtcaaggc 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsAct1 gene specific primer

<400> 9
agtctcatgg atacccgcag 20