



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년11월30일
(11) 등록번호 10-0928911
(24) 등록일자 2009년11월20일

(51) Int. Cl.

A01H 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-0019688
(22) 출원일자 2002년04월11일
심사청구일자 2007년03월23일
(65) 공개번호 10-2002-0079579
(43) 공개일자 2002년10월19일

(30) 우선권주장
09/832,626 2001년04월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
WO19997044473 A1*
US3029168 A*
WO2000054606 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

브루놉 투 비.브이.
네덜란드 6824 비엠 안헴 벨페웨그 76
코외페라티에 아베베 유.에이.
네덜란드 9607 피티 폭스홀 아베브웨그 1

(72) 발명자

바이서리차드지.에프.
네덜란드 6721이티벤네콤엠마란17
래마커스크리스티앙제이.제이.
네덜란드 6836
씨엔아르느햄디알.더블유.드로에싱겔39
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김재만, 유미특허법인

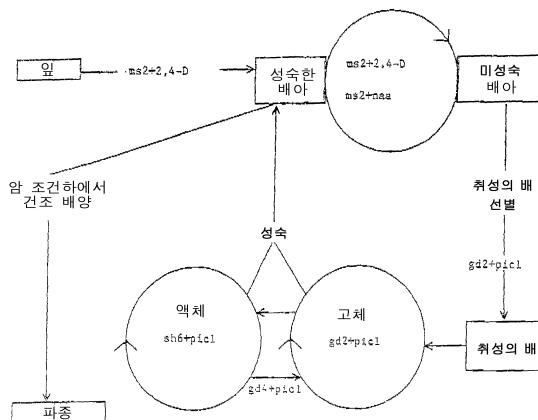
전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이충호

(54) 재생된 카사바 식물로부터 전분을 분리하는 방법 및 그로부터 분리된 전분

(57) 요 약

본 발명은 카사바 또는 밀접한 관련 종의 원형질체를 제조하는 방법으로서, 상기 원형질체는 식물로 재생할 수 있다. 상기 방법은 카사바 또는 밀접한 관련 종으로부터 쥐성의 배아발생 칼루스를 제조하는 단계 및 상기 쥐성의 배아발생 칼루스로부터 원형질체를 분리하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 상기 방법에 의해 얻을 수 있는 원형질체에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 그러한 카사바 또는 밀접한 관련 종의 원형질체를 형질전환시키는 방법, 그리고 이 방법에 의해 얻을 수 있는 형질전화 원형질체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이들 원형질체로부터 식물을 재생하는 방법, 그리고 이 방법에 의해 얻을 수 있는 카사바 식물 또는 밀접한 관련 종에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1

(72) 발명자
야콥슨에버트
네덜란드6706비디바게닌겐리츠마보스웨그77

반딜렌요한나엘리자베스엠. 베르게르보에트
네덜란드6871제이엠렌콤호겐캠프스웨그119

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

카사바의 외식편(explant)으로부터 취성(friable)의 배아발생 칼루스를 얻고, 상기 취성의 배아발생 칼루스로부터 원형질체를 분리하고, 상기 원형질체가 배아를 생산하도록 유도된 후, 상기 배아가 식물을 생산하도록 유도됨으로써 제조되는 식물로 재생될 수 있는 원형질체로부터 식물을 재생함으로써 얻어지는 카사바 식물의 괴경으로부터 전분을 분리하는 방법으로서, 상기 원형질체는 아밀로스의 생산을 억제하는 안티센스 유전자를 가지는 벤터에 의해 형질전환된 원형질체이며, 상기 원형질체로부터 재생된 카사바 식물의 괴경으로부터 전분을 분리하는 방법은,

- 상기 괴경을 세척한 뒤, 마쇄 및 분쇄하는 단계;
 - 분리기 내에서 섬유 및 즙으로부터 전분을 분리하는 단계;
 - 상기 전분을 체질하는 단계;
 - 상기 전분을 세척하는 단계; 및
 - 상기 전분을 건조시키는 단계
- 를 포함하는 전분의 분리 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 전분을 하이드로사이클론에서 세척하는 전분의 분리 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 전분을 진공 필터 내에서 건조시킨 뒤, 건조 타워 내에서 건조시키는 전분의 분리 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<11> 유전자 변형 또는 형질전환은 하나 이상의 유전자(들)를 상업적으로 유용한 유전자형 또는 클론에 부가하는 기술이다. 원칙적으로, 성공적인 형질전환 시스템에는 특정 식물의 부분(줄기, 잎, 마디 등) 또는 특정 식물의 부분에서 유도된 특정 조직(체세포 배아, 배아발생 칼루스, 취성의 배아발생 칼루스) 또는 이를 부분으로부터 유래된 원형질체(세포벽이 없는 단세포) 또는 DNA 분자를 식물의 부분 또는 원형질체로 전달하는 시스템 및 도입된 유전자(들)를 함유하고 발현시키는 조직 및 식물을 선별하는 시스템인 특정 조직으로부터 새로운 식물이 형성되는 효과적인 시스템이 요구된다. 원칙적으로, 원형질체는 DNA 전달을 위한 가장 이상적인 시스템이다. 이들은 식물이 발생하는 다세포 콜로니를 생산하는 단세포로서 배양될 수 있다. 원형질체로부터 유래된 식물은 일반적으로 본래 클론성이다. 이는 형질전환 식물에서 키메리즘을 제거하기 때문에 임의의 형질전환 시스템에 유용한 기구를 제공한다.

<12> 카사바는 원형질체의 식물 재생에 대해 매우 완강하다. 단지, 카사바의 원형질체로부터의 발아 재생이 보고된 바 있다(Shahin 및 Shephard, 1980). 그들은 원형질체의 분리를 위해 잘 팽창된 잎을 사용하였다. 그 이후로는 상당한 노력에도 불구하고, (잎, 줄기 및 뿌리로부터 분리된) 원형질체로부터의 식물 재생이 보고된 바 없다(Anonymous, 1985; Nzoghe, 1991; Anthony 외, 1995, Sofiari, 1996). 논리적인 접근방법은 배아발생 세포를 함유하는 조직을 사용하는 것이었다. 이러한 세포는 옥신 강화 배지에서 배양된 정상의 분열조직, 어린 잎 또는 체세포 배아에서 발견된다(Stamp 및 Henshaw, 1987a; Raemakers 외, 1993a). 그러나, 이를 조직으로부터 분리된 원형질체는 최상의 경우에 녹색 칼루스 및 부정근을 제공하였다(Sofiari, 1996). 최근, 체세포 배아발생의 새로운 유형이 개발되었다. 이 시험관내 시스템에서, 배아는 (예비) 구형 단계 이상으로 발생하지

않으며, 배아발생 칼루스는 매우 취성(friable)이다(Taylor 외, 1995). 이러한 취성의 배아발생 칼루스(FEC)를 액체 배지로 옮긴 결과 혼탁액과 유사한 배지가 얻어졌다. 부추(Buitenveld 및 Creemers, 1994), 피튜니아(Power 외, 1979), 벼(Kyozuka 외, 1988), 사탕수수(Chen 외, 1988) 및 밀(Chang 외, 1991)에서, 이러한 배지는 원형질체의 발생을 위한 우수한 공급원이었다. 본 발명자들은 지금까지는 카사바 FEC가 식물로 재생할 수 있는 원형질체를 분리할 수 있는 유일한 조직임을 발견하였다. 본 발명자들은 또한 FEC가 아밀로오스를 실질적으로 포함하지 않는 전분을 함유하는 과정을 가지는 카사바 식물을 재생시키는 데 사용될 수 있음을 발견하였다.

<13> 본 출원은 본 발명에 참고로 인용된 특허출원 USSN 09/180,481의 부분 계속 출원인 특허 출원 USSN 09/832,626의 부분 계속 출원이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<14> 본 발명은 카사바 또는 밀접한 관련 종의 식물로 재생 가능한 원형질체를 제조하는 방법, 그리고 이러한 방법에 의해 얻어지는 원형질체 및 그 원형질체로부터 성장한 식물을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

<15> 따라서, 본 발명은 식물로 재생할 수 있는 카사바 또는 밀접한 관련 종의 원형질체를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 카사바 또는 밀접한 관련 종의 외식편으로부터 취성의 배아발생 칼루스를 생산하는 단계, 그리고 상기 취성의 배아발생 칼루스로부터 원형질체를 분리하는 단계를 포함한다. 이하에 설명한 바와 같이, 적합한 원형질체를 얻기 위해서는 FEC 용액 내에서의 배양이 매우 중요하다. 그러므로, 본 발명은 또한 취성의 배아발생 칼루스를 액체 배지 내에서 배양하는 방법을 제공한다.

<16> 원형질체는 식물 세포의 세포벽을 효소적으로 붕괴시켜 생산하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 셀룰라 아제, 페톨라아제 및/또는 마세로자임과 같은 세포벽의 혼합물을 원형질체의 생성에 사용하는 방법을 제공한다.

<17> 본 발명에 따르는 방법은 외식편이 취해질 식물을 사전 처리하는 경우에 가장 효과적인 듯 하다. 그러므로, 본 발명은 외식편이 취해지는 식물을 이하에 설명한 바와 같이 옥식으로 사전 처리하는 방법을 제공한다.

<18> 외식편 상에서 배아발생은 취성의 배아발생 칼루스가 1차, 2차 또는 또는성 배아발생 조직으로부터 생산되는 본 발명의 방법의 결과로서 유도하는 것이 바람직하다. 그 이유는 이하의 상세한 설명에서 설명한다. 상기에 기재된 바와 같은 방법을 통해 얻을 수 있는 원형질체도 본 발명의 일부이다.

<19> 식물로 재생할 수 있는 원형질체를 얻고자 하는 중요한 이유는 물론 임의의 다른 적합한 방법을 통해 부가의 유전자 정보를 원형질체로 용이하게 형질전환 또는 형질도입 또는 제공할 수 있다는 것이다. 그러므로, 이제는 누구나 관심 유전자 물질을 함유하는 카사바 식물 또는 밀접한 관련 종을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 아그로박테리아 종창(Agrobacterium tumefaciens)과 같은 부가의 유전자 정보를 포함하는 박테리아에 의한 감염을 통해 원형질체에 상기 부가의 유전자 정보를 제공하거나, 부가의 유전자 정보를 포함하는 백터를 제공하는 전기천공 또는 화학적 천공, 혹은 부가의 유전자 정보로 코팅된 입자의 충격을 통해 카사바 또는 밀접한 관련 종의 원형질체를 형질전환시키는 방법(임의의 적합한 방식으로 제공하는 것으로 한정됨)을 제공하며, 이때 취성의 배아발생 칼루스로부터 얻을 수 있는 원형질체가 형질전환된다. 본 발명은 또한 이러한 방법에 의해 얻을 수 있는 형질전환된 원형질체를 포함한다.

<20> 이하에서는 카사바와 같은 형질전환 식물의 유용성을 간단히 소개한다.

<21> 식물 유전자 공학의 활용에는 유용한 유전자의 분리, 그들의 특정화 및 조작에서 변형된 구조체의 식물로의 재도입에 이르는 다수의 상이한 기술이 포함된다(Lonsdale, 1987). 식물 유전자 기술은 식물 육종의 발전을 촉진 할 것이며, 이는 벼(Chen 외, 1987; Shimamoto 외, 1989), 메이즈(Gordon-Kamm 외, 1990; Visser 외, 1993), 밀(Marks 외, 1989) 및 감자(De Bloch, 1988; Visser 외, 1989)와 같은 형질전환 작물의 몇몇 예로 예시된다. 유전자 기술에 있어서의 급속한 발전은 식물 병원체 인식의 복잡한 문자 메커니즘 및 숙주 식물의 자연 방어책을 통찰하도록 하였다. 이 기술은 전통적인 육종 가능성 이상으로 바람직한 유전자형의 조절되고 효과적인 동정에 사용할 수도 있다.

<22> 예를 들면, 혼탁액 배지로부터 유래된 원형질체의 전기천공법은 메이즈(Rhodes 외, 1988), 벼(Toriyama 외, 1988) 및 오처드그래스(Horn 외, 1988)의 형질전환을 유발하였다.

- <23> 타피오카에서의 토바코바이러스(Powel Abel 외, 1986), 감자에서의 프로텍스바이러스(Hoekema 외, 1989) 및 파파야에서의 프로텍스바이러스(Fitch 외, 1992)와 같은 병원성 바이러스에 대한 내성을 개선시키고자 하는 성공적인 시도가 이루어졌다. 상기 예에서, 도입된 특성은 코트 단백질을 코딩하는 단일 유전자의 발현을 기준으로 하였다. 카사바에서, 아프리카의 카사바 모자이크 바이러스(ACMV) 및 카사바 공통의 모자이크 바이러스(CCMV)는 코트 단백질-매개의 내성 기술에 의해 방제할 수 있다(Fauquet 외, 1992). 용이한 안티센스 방법을 이용한 유전자 형질전환에 의해 카사바 시안생성을 조작하는, 시안형성(cyanogenesis)의 중요한 효소를 코딩하는 유전자들이 클로닝되었다(Hughes 외, 1994). 본 발명의 다른 구현에는 카사바 괴경 내의 전분을 조작하는 것이다.
- <24> 따라서, 본 발명은 부가의 유전자 정보가 안티센스 구조체, 특히 아밀로오스 합성 경로를 억제할 수 있는 안티센스 구조체를 포함하는 형질전환 원형질체를 제공한다.
- <25> 원형질체는 야외에서 배양할 수 있으며, 경작할 수도 없다. 원형질체가 형질전환에 필요하기는 하지만, 상기 원형질체를 배아 및/또는 식물로 재생시킬 수 있어야 한다. 이는 원형질체로부터 재생하기 어렵다는 것이 밝혀졌기 때문에 본 발명의 매우 중요한 구현에 중 하나이다. 상세한 설명에서는 이것이 어떠한 방식으로 달성될 수 있는지를 설명한다. 추가의 정보에 대해서는 E. Sofiari에 의해 집필된 "Regeneration and Transformation of Cassava"라는 표제의 논문(*Manihot Esculenta Crants*)을 참조할 수 있으며, 이는 본 출원에 동봉되었으며, 본 출원에 참고로 인용되었다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 따르는 원형질체를 도입하여 배아를 생산하고, 그 결과로서 식물을 생산하는 배아를 유도하는 원형질체로부터의 식물을 재생하는 방법을 제공한다.
- <26> 상기 방법에 의해 얻어질 수 있는 식물, 특히 그 괴경이 아밀로오스를 본질적으로 함유하지 않는 식물도 본 발명의 일부이다.
- <27> 또한, 본 발명은 상기 카사바 식물의 괴경으로부터 전분을 얻는 방법을 제공한다. 상기 방법은 감자 괴경으로부터 전분을 분리하는 방법과 본질적으로 유사한 방식으로 수행될 수 있다. 본 발명의 한 구현예에서, 상기 방법은 괴경을 세척하는 단계, 이들을 마쇄 및 분쇄하는 단계를 포함한다. 이후, 예를 들면 원심분리기 또는 하이드로사이클론과 같은 분리기 내에서 섬유 및 즙으로부터 전분을 분리한다. 이어서, 분리된 전분을 체질하고, 세척하여 건조시킬 수 있다. 세척은 하이드로사이클론 내에서 수행할 수 있다. 건조는 진공 필터 및 건조 타워 내에서 수행할 수 있다.
- <28> 증가된 아밀로펙틴 함량을 갖는 카사바 괴경으로부터 얻은 전분은 본 발명의 일부이다. 이 전분은 전분의 (건조 물질) 중량을 기준으로 적어도 약 90 중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 95 중량%, 가장 바람직하게는 적어도 약 98 중량%의 아밀로펙틴 함량을 가지는 것이 바람직하다. 본 명세서에서 아밀로펙틴 전분 또는 저아밀로오스(low amylose) 전분은 이러한 증가된 아밀로펙틴 함량을 갖는 식물로부터 얻어지는 전분을 의미한다. 또한, 상기 전분은 이하에서 추가로 설명되는 분자량, 고유 점도, 입자 크기 및 사슬 길이 분포와 같은 많은 독특한 특성을 갖는다.
- <29> FEC의 개시
- <30> FEC를 얻는 절차는 도 1에 개설하였다. 먼저, 1차 배아의 도입으로 시작한다. 1차 배아는 2단계 과정에서 형성된다. 제1 단계에서, 1차 배아를 염 및 비타민(바람직하게는 Murashige 및 Skoog(1962)), 탄화수소 원료(예를 들면 20 g/l의 수크로오스) 및 옥신(예를 들면, 1-8 mg/l의 피클로람이나, 디캄바 또는 2,4-D)이 강화된 배지에서 배아가 개시되는 동안 배양한다. 이러한 제1 배지에서 10일 내지 15일 후, 쌍극의 어뢰형 배아가 형성된다. 어뢰형 배아는 투명한 배축 및 자엽 원기(primodia)를 함유한다. 배축형 배아를 가지는 외식편을 단계 2 배지(옥신을 함유하지 않고 카이토키닌을 부가한 것을 제외하고는 단계 1의 배지와 동일한 배지)로 옮긴 후, 배축형 배아를 성숙시킨다. 성숙한 배아는 녹색의 큰 자엽을 함유한다.
- <31> 1차 배아를 얻기 위해서는 접합 배아(Stamp 및 Henshaw, 1987a; Szabados 외, 1987; Mroginsky 및 Scocchi, 1993; Raemakers, 1993a; Narayanaswamy 외, 1995) 및 화조직(floral tissue; Mukherjee, 1995, Woodward 및 Puonti-Kaerlas, 2001)을 사용할 수 있다. 이 경우, 많은 상이한 유전자형을 1차 배아를 형성하는 그들의 능력에 대해 평가하였다. 이 프로토콜에서, 1차 체세포 배아는 고체 배지에서 배양한 후에만 형성되었으며, 액체 배지에서 배양한 후에는 전혀 형성되지 않았다. 더욱이, 체세포 배아(1차)는 옥신 Picloram, Dicamba 또는 2,4-D는 사용하고 IAA, IBA 또는 NAA는 사용되지 않은 경우에만 발견되었다.
- <32> 최근 사용된 프로토콜에는 배양된 외식편당 형성된 성숙한 배아의 개수에 있어 유전형적 차이가 있다. 유전형 M. Col1505, M. Col122 및 Gading은 배양된 잎의 외식편당 가장 많은 개수의 성숙한 배아를 나타냈다(ME/CLE).

그러나, 형성된 성숙한 배아의 개수는 작았다. M. Co122에서, 시험관내 배양 식물로부터 분리하여 4 mg/l 의 2,4-D를 함유한 배지에서 배양한 일 외식편의 최대 20%가 0.8 ME/CLE로 최대 개수의 ME를 형성하였다. 8 mg/l 의 2,4-D를 함유하는 단계 1 배지에서, 일 외식편의 최대 49%가 3.5 Me/CLE로 최대 개수의 ME를 형성하였다. 더 높은 농도의 2,4-D는 외식편의 배아발생 능력을 추가 개선시키지 못했다.

<33> 1차 체세포 배아를 생산하는 일 외식편의 능력을 개선시키고자하는 목적에서, 공여체 식물을 상이한 조건 하에서 재배하였다. 상이한 명소(8, 12, 16 또는 24시간)에서 시험관내 공여체 식물의 성장은 배아발생 반응에 아무런 영향을 주지 않았다. 그러나, 광도의 감소는 긍정적인 영향을 나타냈다. 최상의 결과는 8 $\mu\text{Ern}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 재배하고 단계 1 배지에서 배양한 공여체 식물의 분리된 일 외식편을 이용하는 경우에 얻어졌다.

<34> 다른 연구자들은 특정 유전형에서, 1차 배아발생을 유발함에 있어 Dicamba(1-66 mg/l) 및 Picloam(1-12 mg/l)이 2,4D보다 우수하다는 사실을 발견하였다(Ng 1992; Sudarmonowati 및 Henshaw, 1993; Taylor 및 Henshaw, 1993). Mathews 등(1993)은 외식편을 단계 1 배지에서 15일간 배양한 후, 0.5%의 차콜이 강화된 성장 조절인자-결핍 배지로 옮겨 유전형 M. Co11505에서의 1차 배아발생의 효율을 개선시켰다. 이 배지에서는 성숙이 개선되었으며, 그 결과로서 성숙한 배아의 개수가 대조군에서의 0.4에서 3.4 ME/CLE로 증가하였다. 최상의 결과는 공여체 식물을 2,4-D 또는 Picloram 또는 Dicamba로서 옥신을 사전 처리한 경우에 얻어졌다. 이를 위해, 식물을 MS20 액체 배지에서 배양하고, 배양 12일 후에 옥신(최종 농도 8 mg/l)을 보충하였다. 2일 후에 일 외식편을 공여체 식물로부터 분리하고, 8 mg/l의 2,4-D, Picloram 또는 Dicamba를 함유하는 단계 1 배지에서 배양하였다. 물론 M. Co122에서, 이는 9.4 ME/CLE의 생산을 가져왔다. 이는 3.5 ME/CLE가 생산된 H₂O-처리 대조군-식물에서보다 현저하게 높은 것이었다(표 3).

<35> 옥신 사전 처리의 일반적인 활용성을 상이한 여러 유전형에 대해 테스트하였다. 공여체 식물의 사전 처리가 없는 경우, 두 유전형은 ME를 낮은 빈도로 형성하였다. 공여체 식물을 사전 처리한 후, 거의 모든 유전형의 일 외식편이 ME를 형성하였다.

<36> 결국, 본 발명자들은 테스트한 28개의 유전형 중 24개의 유전형으로부터 성숙한 1차 체세포 배아를 얻을 수 있었다(표 1, TMS30221, TMS30001, TMS30572 및 상파울로 제외). 이들 데이터는 카사바 내의 거의 모든 유전형이 체세포 배아발생을 진행할 수 있음을 시사하며, 이는 지금까지 60개 이상의 유전형에서 이들이 1차 체세포 배아발생을 진행할 수 있는 것으로 밝혀졌다(Thro 외. 1999).

<37> 접합체 배아 및 일에서 유래된 1차 체세포 배아가 2차 배아를 개시하는 외식편으로서 사용하였다(Stamp 및 Henshaw, 1987a; Szabados 외, 1987; Mathew 외, 1993; Raemakers 외, 1993bc; Luong 외, 1995). 옥신 강화 배지에서 체세포 배아를 연속 배양한 결과, 체세포 배아발생의 또는 시스템이 얻어졌다. 2차 배아발생을 위해 체세포 배아를 계대배양하는 방식은 배아발생 조직의 형태에 영향을 주는 것으로 여겨진다. 암소에서 2,4D를 함유하는 액체 배지에서 매월 재배양한 체세포 배아의 군집은 초기에는 노숙한 배아의 상부 상에 형성된 핑거형 배아로 발생하였다. 이 배아는 어뢰형 단계를 통과하지 않았다.

<38> 추가의 발생은 배아를 함유한 크럼프를 명소의 단계 2 배지로 옮겨 경우에 발생하였다(Szabados, 1987). 정상적으로 성숙한 체세포 배아를 명소에서 단계 1 배지에서 배양하고, 20일 후에 성숙을 위해 외식편을 단계 2 배지로 옮겼다. 이 시스템에서, 배아는 성숙하게 발생하였으며, 녹색의 큰 자엽을 갖는 성숙한 배아를 배아발생의 새로운 사이클을 시작하기 위해 사용하였고, 다른 시스템에는 어뢰형 배아를 2차 체세포 배아발생의 새로운 사이클을 시작하기 위해 사용하였다. 이러한 성숙한 배아의 종식 시스템은 표 1에 언급된 유전형의 14 20에서 테스트하였다. 모든 유전형에서, 단지 몇 개의 성숙한 배아만이 활용 가능하다는 사실에도 불구하고, 하나를 제외한 모든 유전형이 2,4-D 강화 배지에서 배양된 후 새로운 성숙한 배아를 1차 체세포 배아발생에서 관찰된 것보다 상당히 높은 빈도로 제공하였다(Raemakers 외, 1993b, c, 200, 2001, Sofiari 외, 1996). 배아발생은 1년 이상 동안 성숙한 배아의 정규 계대배양에 의해 유지되었다(Szabados 외, 1987; Mathews 외, 1993; Raemakers, 1993). 새로운 체세포 배아가 액체 및 고체 배지에서 형성되었다. 모든 유전형에서, 고체 배지보다 액체 배지에서 더 많은 배아가 형성되었으며, 2차 체세포 배아발생의 새로운 사이클의 시작 전의 배아의 분열은 온전한 배아에 비해 생산률을 증대시킨 것으로 관찰되었다. 예를 들면 M. Co122에서, 고체 배지에서 배양된 온전한 배아는 배양된 배당 8개의 배아를 생산한 반면, 액체 배지에서 배양된 분열 배아는 배양된 배당 32개의 배아를 생산하였다(Raemakers 외, 1993c). 2,4-D, Picloram 및 Dicamba뿐 아니라, NAA도 2차 배아발생을 유도하는 능력을 갖는다. IBA 및 IAA는 2차 배아발생을 유도하지 못했다. NAA는 Adira A, Adira4, Gading, Line 11, M. Co122, M. Co11505 및 Garding에서 성공적으로 사용되었다(Sofiari, 1996). 일반적으로, NAA 강화 배지에서가 2,4-D, Picloram 또는 Dicamba 강화 배지에서보다 성숙한 배아를 더 많이 생산하였다. 나아가,

NAA에 의해 유발된 배아의 발생은 2,4-D, Picloram 또는 Dicamba를 이용하는 경우보다 빨랐다. 배양 기간을 단축시키는 것이 대규모 작업의 경우에 특히 유리한 효과를 갖는다.

<39> 조직학적으로, 2,4-D에 의해 새롭게 유발된 2차 배아는 외식편에 수직으로 부착한 반면, NAA에 의해 유발된 것들은 수평적으로 부착하였다.

<40> 일부 과학자들은 여전히 카사바의 특정 유전자형에서 배아발생 배지를 얻는데 문제를 안고 있다(Mroginski 및 Scocchi, 1992; Taylor 외, 1992; Narayanaswamy 외, 1995; Sudarmonowati 및 Bachtiar, 1995). 주된 문제는 이 1차 외식편 유래의 배아발생 조직을 얻을 수 없다는 것이 아니고, 2차 배아발생에 의한 이 조직의 대규모 증식이 불가능하다는 것이다. 이러한 목적을 위하여, 성숙한 배 또는 어뢰형 배로 이루어지는 조직을 사용할 수 있다. 어뢰형 배아의 증식은 고도의 유전형 의존성인 반면, 성숙한 배아의 증식은 대부분 유전형 비의존성이다(Raemakers, 1993). 1차 및 2차 체세포 배아발생 모두 쌍극 구조를 갖는 변식체(propagule)의 형성을 특징으로 한다. 이러한 쌍극의 어뢰형 배아는 옥신이 강화된 단계 1 배지에서 이미 형성된다. 따라서, Taylor 등(1995)은 유기적 배아발생이란 용어를 제안하였다. 유기적 세포는 특정한 통합체로 형성되는 조직 및 기관을 가지는, 능동적으로 분열하는 세포의 군으로서 정의된다(Walker, 1989).

<41> 몇몇 유기적인 유형의 체세포 배아발생이 Taylor 등(1995)에 의해 개발되었다. 연속 선별을 통해, 10 mg/l의 Picloram(GD2)이 강화된 Gresshoff 및 Doy(1972) 염 및 비타민 배지에서 배양된 유기적인 배아발생 조직은 보다 작은 유기 조직으로 점진적으로 전환되었다. 이 조직은 매우 취성인(전구) 구형 배아의 칼루스 유사 물질로 이루어진다. 그러므로, 이 조직을 취성의 배아발생 조직(FEC)이라 칭하였다. FEC 내의 세포는 연속적으로 이들이 그룹 통제에서 이탈하는 단계이고, 그들은 통합된 구조로 조직되지 않기 때문에 FEC는 Gresshoff 및 Doy(1972) 비타민 및 염, 7 g/l Daichin 아가, 20 g/l 수크로오스 및 10 mg/l Picloram(고체 GD2)로 이루어지는 배지 상에서 유지된다. 3주마다 취성의 배아를 상기 배지에서 계대배양하였다. 액체 혼탁물 배양을 개시하기 위하여, 취성의 배 0.5 g을 Schenk 및 Hildebrandt(1972) 염 및 비타민, 60 g/l의 수크로오스 및 10 mg/l의 Picloram(액체 SH6)으로 강화된 50 ml의 액체 배지를 함유하는 200 ml의 플라스크로 옮겼다. 2-7일마다 배지를 새로 교체하고, 14일 후 각 플라스크의 함유물을 5개의 새로운 플라스크 상에 나누었다. 오토클레이브 전에 pH를 5.7로 조절하였다. 배양 챔버 내의 온도는 30°C였고, 광조건 하에서 12시간, 광도는 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 였다. 6%의 수크로오스 및 10 mg/l의 Picloram(SH6)가 강화된 Schenk 및 Hildebrandt(1997) 배지에서 FEC를 배양하여 혼탁액 배양을 개시하였다. 2-3일마다 배지를 새로 교체하였다.

<42> 배양물을 고도의 취성 상태로 유지하기 위하여, FEC를 2개월에 1회씩 체질해야 한다. 실제, 1 mm² 면적의 체로 선별하고자 하는 FEC는 계대배양을 위하여 사용될 것이다.

<43> FEC는 GD2 또는 SH6 상에서 어뢰형 배아를 거의 전혀 형성하지 않을 것이다. 어뢰형 배 및 후속의 성숙한 배아는 FEC가 성숙 배지에서 배양되는 경우에 형성된다. 성숙 배지는 Murashige 및 Skoog(1962) 염 및 비타민, 1 mg/l의 Picloram로 이루어진다. 이 성숙 배지는 3주마다 새로 교체하였다.

<44> 성숙한 배아는 2,4-D, Picloram, Dicamba 또는 NAA가 강화된 MS20 배지에서의 배양에 의해 2차 체세포 배아발생으로 유도될 수 있었다. 1차 및 2차 체세포 배아발생은 광범위한 유전형에서 확립하기가 비교적 용이한 반면(표 1 참조), FEC는 당분간 몇몇 유전형으로 제한된다. 체세포 배아발생 및 유전자 형질전환의 새로운 시스템을 위한 FEC의 전망은 이 시스템을 더 많은 유전형에 활용할 수 있도록 하는 데는 추가의 연구가 요구되기는 하지만 유망하다. 이 과정의 본질적인 요소는 고품질 유기 조직의 활용성 및 FEC로 전환할 수 있는 이 조직의 능력이다. Taylor 등(1995)은 FEC를 개시하는 어뢰형 상태에서 증식된 유기적인 배아발생 조직을 사용하였다. 이 경우, 두 단계(유기적 조직의 개시 및 비유기적 조직으로의 전환)가 FEC의 성공적인 개시에 대해 결정적이다. 두 단계 모두 유전자 의존성이다. Raemakers(1993)에 의해 설명된 바와 같이 유기적 조직이 성숙한 상태에서 증식되는 경우에는 FEC로 전환하는 조직의 능력만이 FEC를 개시하는 결정적인 단계이다. 유기적 조직이 출발 물질로서 사용될 수 있는지의 여부에 대해서는 아직 연구 중이다. 유기적 조직이 사용될 수 없는 경우, 이 조직은 먼저 FEC를 개시하기 위해 사용하기 전에 성숙한 상태에서 증식되어져야 한다. 이는 외식편의 고밀도 배양 또는 또는기간의 감소 중 하나에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

<45> FEC주는 R60, R90, M7, TMS60444 및 Adira 4에서 얻어졌다(Raemakers 외, 2000, 2001). FEC로부터의 식물 재생은 R60, R90, M7, TMS60444 및 Adira 4에서 달성되었다(Raemakers 외, 2000, 2001). Taylor 등(2000)은 line 2, M. Col11505, TMS90853, Kataoli 및 Bonoua Rouge에서 FEC주를 얻었다.

<46> 원형질체로부터 식물의 재생

<47> 원형질체의 분리

<48> 원형질체의 분리를 위하여, 고체 GD2 및 액체 SH6에서 배양된 FEC 모두를 사용하였다. 원형질체의 최고 수율은 액체 SH6에서 1 내지 3주 동안 배양한 FEC로부터 얻어졌다.

<49> FEC 2g을 10 ml의 세포벽 분해 용액을 함유하는 페트리 디시(Φ 9 cm)에 넣었다. 세포벽 분해 용액은 세포벽 분해효소; 10 mg/l의 퀘톨라아제, 10 g/l의 셀룰로오스, 200 mg/l의 마세로 효소 성장 조절인자(NAA 1 mg/l, 24-D 1 mg/l, Zeatin 1 mg/l); 주염(major salt; 368 mg/l의 CaCl₂; 34 mg/l의 KH₂PO₄; 740 mg/l의 KNO₃; 492 mg/l의 MgSO₄.H₂O); 부염(minor salt; 19.2 mg/l의 Na-EDTA; 14 mg/l의 FeSO₄ · H₂O); 및 오스코티 컴(91 g/l의 D-만니톨) 및 0.5 g/l의 MES의 혼합물로 이루어진다. 세포벽 분해 효소 셀룰라아제(1-10 g/l)와 마세로자임(200 mg/l)은 원형질체 분리에 성공적이다. 퀘톨라아제(0.001-0.01 g/l) 및/또는 드리셀라아제(0.02 g/l)의 가외 첨가는 원형질체의 수율을 증가시켰다. 18시간 배양 후, 10 ml의 세척 매질을 용액에 첨가하였다. 오스몰 농도 0.530 mOsm/kg의 세척 매질은 주염(세포벽 분해 용액 참조), 45.5 g/l의 만니톨 및 7.3 g/l의 NaCl로 이루어졌다. 분해된 조직을 73 μM 다공 크기의 필터(PA 55/34 Nybolt-Switzerland)를 통해 250 ml의 유리 비커로 여과하였다. 여과물을 2개의 12 ml 원뿔형 스크류 캡 튜브 상에 동등하게 나누어 넣고, 600 rpm에서 3분간 원심분리하였다(Mistral 2000). 상청액을 제거한 후 세척 과정을 1회 반복하였다. 원형질체 용액을 주염 및 부염(세포벽 분해 용액 참조) 및 105 g/l의 수크로오스를 함유하는 9.5 ml의 용액에 부유시켜 재현탁하였다. pH는 5.8이었고, 오스몰 농도는 0.650 mOsm이었다. 원형질체를 함유하는 용액을 5분 동안 평형화시키고, 0.5 ml의 세척 매질을 상부에 서서히 첨가하였다. 700 rpm에서 15분간 원심분리한 후(Mistral 2000), 원형질체를 수크로스와 세척 매질 사이의 밴드에 집중시켰다. 원형질체 층을 파스퇴르 피펫으로 수확하고, 수율은 표준 혈구계(haemocytometer) 챔버에서 계측하였다.

<50> 원형질체 배양

<51> 원형질체를 페트리 디시에서 동일한 액체 배지를 함유하는 0.2 w/v%의 아가로스(Dons en Bouwer, 1986)로 고형화한 배지에서 배양하였다. 하기의 배지는 마이크로 칼루스의 형성을 유발하였다:

<52> - 옥신(0.1-10 mg/l의 NAA 또는 0.1-10 mg/l의 Picloram, 또는 0.1-10 mg/l의 IAA, 또는 0.1-10 mg/l의 2,4-D, 또는 0.1-10 mg/l의 Dicamba, 또는 0.1-10 mg/l의 또는 0.1-10 mg/l의), 또는 옥신과 사이토키닌(0.01-1 mg/l의 제아틴, 0.01-1 mg/l의 2-iP, 0.01-1 mg/l의 BA, 0.01-1 mg/l의 TDZ, 0.01-1 mg/l의 카이네틴)이 강화된 TM2G 배지(Wolters 외, 1991);

<53> - 옥신(0.1-10 mg/l의 NAA 또는 0.1-10 mg/l의 Picloram, 또는 0.1-10 mg/l의 IAA, 또는 0.1-10 mg/l의 2,4-D, 또는 0.1-10 mg/l의 Dicamba), 또는 옥신과 사이토키닌(0.01-1 mg/l의 제아틴, 0.01-1 mg/l의 2-iP, 0.01-1 mg/l의 BA, 0.01-1 mg/l의 TDZ, 0.01-1 mg/l의 카이네틴)이 강화된 배지 A(Murashige 및 Skoog(1962) 염 및 비타민, 4.5 g/l의 마이오-이노시톨, 4.55 g/l의 만니톨, 3.8 g/l의 자일리톨, 4.55 g/l의 소르비톨, 0.098 g/l의 MES, 40 mg/l의 아데닌설페이트 및 150 mg/l의 카제인 가수분해물, 0.5 mg/l의 d-칼슘-판토테네이트, 0.1 mg/l의 콜린-클로라이드, 0.5 mg/l의 아스코르브산, 2.5 mg/l의 니코틴산, 1 mg/l의 피리독신-HCl, 10 mg/l의 티아민-HCl, 0.5 mg/l의 폴산, 0.05 mg/l의 바이틴, 0.5 mg/l의 클리신, 0.1 mg/l의 L-시스테인 및 0.25 mg/l의 리보플라빈 및 59.40 g/l의 글루코오스).

<54> 9 ml의 새로운 배지를 교체하여 배지를 매일 새롭게 하였다. 제1 배지에서 2개월 동안 배양한 후, 고품질의 FEC를 선별하고 추가 증식 또는 성숙을 위해 배양하였다. 증식을 위하여, FEC를 40 g/l의 수크로오스, 7 g/l의 Daichin 아가 및 2 mg/l의 Picloram이 강화된 Gresshoff 및 Doy(1974) 배지로 옮겼다. 3주 후, FEC를 20 g/l의 수크로오스, 7 g/l의 아가 및 10 mg/l의 Picloram(GD2)이 강화된 Gresshoff 및 Doy(1974) 배지로 옮겼다. 1.0 g의 FEC를 10 mg/l의 Picloram으로 강화된 액체 SH6% 배지로 옮겨 혼탁액 배양을 개시하였다. 2주 후, 혼탁액을 1.0 ml의 초기 밀집 세포 부피로 새로운 플라스크로 나누었다.

<55> 2개월 동안 배양한 후, 10⁴의 원형질체는 0.5 mg/l의 NAA 및 1 mg/l의 제아틴으로 강화된 TM2G에서 1058 마이크로-칼리를 생산하는 10⁵/ml의 밀도에서 배양하고, 10⁴의 원형질체는 1058 마이크로-칼리를 생산하는 10⁶/ml의 밀도에서 배양하였다.

<56> TM2G 배지를 배지 A로 교체하여 두 밀도 모두에서 마이크로-칼리의 수를 현저하게 감소시켰다. 이 단계에서,

적어도 3가지 유형의 칼리가 구별될 수 있다. 한가지 유형은 대부분 10^6 의 밀도에서 배양된 원형질체에서 발견된 구형의 배로 이루어졌다. 이들의 일부는 밝은 녹색의 자엽 유사 구조를 발생시킨다. 그러나, 이를 배아는 적절하게 발아할 수 없었다. 다른 유형은 급속 성장하여 크고 치밀한 칼루스를 형성하으며, 이들은 두 밀도 모두의 원형질체 배지에서 발견되었다. 이 칼루스는 배아를 전혀 발생시키지 않았다. 세 번째 유형은 고도의 취성 칼루스였으며, 두 밀도 모두에서 관찰되었다. $2-5 \times 10^5$ 의 밀도에서(배지 TM2G), 약 60%의 칼리가 취성이었으며 배아발생성이었다. 추가의 증식 또는 성숙을 위해 FEC를 계대배양하였다.

<57>

원형질체로부터 유래된 FEC의 증식

<58>

FEC를 선별한 뒤, 0.1 g을 2 mg/l 의 Picloram이 부가된 GD4 상에서 3주 동안 배양하여, 0.7 g의 조직으로 증가시켰다. 95% 이상의 조직은 고품질의 FEC로 이루어졌다. 후속하여, 이 조직을 10 mg/l 의 Picloram가 강화된 GD2 상에서 3주 동안 계대배양하여 유지시켰다. 혼탁 배양을 개시하기 위하여, FEC를 액체 배지로 옮겼다. 이 물질의 밀집 세포 부피(PCV)의 증가는 원래 물질보다 약간 높았다(데이터는 제시하지 않음).

<59>

원형질체로부터 유래된 FEC의 성숙

<60>

배아의 성숙을 유도하기 위하여, TM2G에서 2개월 동안 배양한 후 분리된 FEC를 성숙 배지 상에서 배양하였다. 성숙 배지는 Murashige 및 Skoog(1962) 염 및 비타민, 10 g/l 의 Daichin 아가, 0.1 g/l 의 마이오-이노시톨, 20 g/l 의 수크로오스, 18.2 g/l 의 만니톨, 0.48 g/l 의 MES, 0.1 g/l 의 카제인 하이드레이트, 0.08 g/l 의 아데닌 세페이트, 0.5 mg/l 의 d-칼슘-판토테네이트, 0.1 mg/l 의 콜린 클로라이드, 0.5 mg/l 의 아스코르브산, 2 mg/l 의 니코틴산, 1 mg/l 의 피리독신-HCl, 10 mg/l 의 티아민 HCl, 0.5 mg/l 의 폴산, 0.05 mg/l 의 바이틴, 0.5 mg/l 의 글리신, 0.1 mg/l 의 L-시스테인, 0.25 mg/l 의 리보플라빈 및 1 mg/l 의 Picloram으로 구성되었다. 이 성숙 배지를 3주 간격으로 교체하였다.

<61>

이 배지에서 증식에서 성숙으로의 점진적인 이동이 있다. 결과로서, 밀집 세포 부피는 액체 성숙 배지에서 2주 배양한 후 인자 4와 함께 증가하였다. 또한, 고체 성숙 배지로 옮긴 후에는 증식이 있었다. 고체 배지에서 2주 후, 대부분의 배아는 구형에 도달하였으며, 이들 구형 배 중 몇몇만이 추가 발생하였다. 제1 어뢰형 배아는 고체 성숙 배지 상에서 1개월 배양한 후 가시화되었다. 성숙한 배 및 어뢰형 배아의 개수는 플레이팅 효율과는 관련이 없고, 초기 배양된 원형질체의 밀도와 관련이 있었다. 원형질체를 성장 조절인자가 함유되지 않은 TM2G에서 배양한 경우에는 그러한 배아가 전형 얻어지지 않았다. 성숙한 배 및 어뢰형 배아의 최고 개수는 0.5 mg/l 의 NAA 및 1 mg/l 의 Zeatin이 강화된 TM2G에서 배양한 원형질체로부터 형성되었다. NAA를 Picloram으로 교체한 경우에는 어뢰형 배 및 성숙한 배아의 개수 현저하게 감소하였다(표 2). 테스트된 Picloram 농도 2 mg/l 에서 최상의 결과가 얻어졌다. 3개월 동안 배양한 후, 60개에서 200개 사이의 어뢰형 배 및 성숙한 배아가 아가로스 그룹당 분리되었다. 어뢰형 배아는 새로운 성숙 배지 또는 0.1 mg/l 의 BAP가 첨가된 MS2에서 배양한 경우 높은 빈도로 성숙되었다.

<62>

원형질체로부터 유래된 성숙한 배아의 2차 체세포 배아발생 및 발아

<63>

10 mg/l 의 NAA 또는 8 mg/l 의 2,4-D가 강화된 액체 또는 고체 MS2 배지에서 배양한 경우, 단지 몇 개의 어뢰형 배만이 2차 배아를 형성하였다(데이터는 제시하지 않음). 성숙한 배아가 2차 배아발생을 위한 더 우수한 외식편이었다. 액체 및 고체 배지 모두에서, 2,4-D는 NAA에 비해 2차 배아발생 유도에 있어 우수하였다. 성숙한 배아를 먼저 2,4-D 중에서 배양한 뒤, 액체 NAA에서 배양한 경우, 반응은 2,4-D 단독 배지 중에서 배양한 경우의 반응과 유사하였다. 2,4-D를 함유하는 배지에서 2차 체세포 배아발생의 한 사이클을 진행한 배도 10 mg/l 의 NAA가 강화된 MS20에서 2차 배아를 매우 효율적으로 생산하였다.

<64>

순환성 또는 2차 체세포 배아의 발아를 액상 배지에서 옥신 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-D) 또는 나프탈렌 아세트산(NAA)에 의해 유도하고 비교하였다. 모든 유전자형에서 건조가 NAA 유도된 배아의 정상적 발아를 자극하였다. 그러나, 건조된 배아는 높은 빈도의 발아를 위한 벤질아미노푸린(BAP)과 같은 사이토키닌이 강화된 배지를 요구한다. 얻어진 묘목의 형상은 BAP의 농도에 의존하였다. 1 mg/l BAP에서는, 두껍고 짧은 직근과 마디와 마디 사이가 짧은 가지의 짹이 형성되었다. 0.1 mg/l BAP에서는, 직근은 가늘고 길고, 짹은 하나 또는 두 개의 정단 분열조직을 가졌다. 배아를 최적으로 건조시키지 못했다면, 배아가 발아를 자극하기에 최적으로 건조된 경우보다 고농도의 BAP가 필요하게 된다. 또한, 암소에서 배양된 건조 배아는 저농도의 BAP를 필요로 하고, 이들 배아는 명소에서 배양된 배아보다 빠르게 발아하였다. 체세포 배양 유발 4주 후에 완전 식물을 얻었다. 2,4-D 유도된 배아에서는 상이한 반응을 나타냈다. 오직 하나의 유전자형 건조물만이 2,4-D 유도된 배아의 발아를 촉진하였고, 3개의 상이한 유전자형에서는 그렇지 않았다. 모든 유전자형에서 건조는 뿌리의 형성을

자극하였다. 암소에서 배양된 배아는 예정대로 부정근을 형성하였으나, 명소에서 배양된 배아는 예정대로 직근을 형성하였다.

<65> 유전자 운반 시스템

과거 수년에 걸쳐, 실리콘 섬유(Kaeppler et al., 1990), 마이크로인젝션(DeLaat and Blaas, 1987) 및 전기 천공법(Griesbach 및 Hammond, 1993)과 같은 DNA를 식물 원형질체로 운반하는 여러 가지 기술이 개발되어 왔다. 가장 공통적으로 사용되고 잠재적으로 활용 가능한 것은 아그로박테리아-매개의 유전자 운반, 마이크로인젝션/입자 충격 및 원형질 전기천공이 있다.

<67> 가장 흔하게 사용되는 기술은 아그로박테리아 종창 DNA 운반 시스템이다. 이것은 아마도 식물에 DNA를 운반한 첫 번째 발명이 이 방법을 사용한 것과 관련이 있을 것이다. 초기에는 Kalachoe와 Solanaceae, 특히 담배로 제한되었으나, 최근에는, 아그로박테리아-매개된 형질전환의 사용은 극적으로 변화하여서, 외떡잎으로 한정된 옥수수와 벼와 같은 중요 외떡잎 식물을 포함하는 광범위한 식물을 형질전환시키는 것이 가능하다(Wordragen 및 Dons, 1992).

<68> 카사바가 아그로박테리아의 숙주이긴 하지만, 이것에 잘 수용되지 않는 것으로 밝혀졌다.

<69> 카사바 유래의 FEC는 아그로박테리아 종창을 통해 효과적으로 형질전환된 바 있다(Raemakers et al., 2000, Schreuder et al., 2001). Raemakers et al., 2000, 및 Schreuder et al., 2001에 기재된 방법을 사용하여 CaMV 프로모터의 제어하에서 안티센스 gbss 유전자를 담지하는 유전자형 Adira 4 및 TMS604444로부터 유전자 변형된 식물을 성공적으로 생산하였다.

<70> 주 원형질체는 DNA 운반을 위한 가장 이상적인 외식편이다. 이들은 단일 세포로 배양되어 식물이 성장하는 다중 세포 콜로니를 생산할 수 있다. 원형질체로부터 유래된 식물은 일반적으로 본래 클론성이다. 유전자이식 식물에서 키메리즘을 제거할 것이므로, 임의의 형질전환 시스템에서 유용한 수단을 제공한다. 그러나 이러한 원형질의 사용에 의해 높은 종 의존성을 가진 생식계에 위험을 초래한다. 형질전환을 위해, 예를 들면 *Lolium multiflorum*(Potrykus et al., 1985) 및 *Triticum monococcum*(Loerz et al., 1985)에 기재되어 있는 바와 같이, PEG와 결착하는 데 원형질체를 사용하여, DNA를 세포질 내에 도입하도록 가역적 투과성이 유발되도록 플라즈마 막을 변형시킨다. 플라즈마 막과 심지어 세포벽에 대해 DNA의 투과성을 증가시키는 다른 기술은 전기천공에 의한 것이 있다(Jones et al., 1987, 감수). 이 방법에서는 전기 펄스에 의해 DNA를 세포 내로 유입시킨다. 벼는 원형질체 전기천공에 의해 얻어진 재생성이 있는 유전자전환 첫 번째 곡류이다(Shimamoto et al., 1989).

<71> 외래 DNA를 운반하기 위해 입자 충격 또는 biolistic을 사용하여 카사바 형질전환에 대한 대안의 방법을 제공한다. 입자 충격은 임의의 조직에서 거의 모든 세포 내로 DNA를 운반시킬 수 있는 유일한 방법이다. 이 방법을 이용하여 얻어진 첫 번째 유전자전환 식물은 담배이다(Klein et al., 1989). 이 형질전환 방법의 성공 후, 입자 충격은 아그로박테리아 감염에 덜 수용적인 식물, 특히 외떡잎 식물에서 널리 사용되고 있다. 입자를 가속화시키는 몇 가지 DNA 운반 장치의 개선은 가장 최근의 모델인 Biolistic™PDS-1000(Bio-Rad Laboratories, 미국 캘리포니아주 Richmond 소재)을 만들었다. 이를 장치는 시판되고 있지만, 현재는 가격이 상대적으로 고가이다. DNA로 코팅된 텅스텐 또는 금 입자가 통상 DNA를 표적 조직에 운반하는 미세투사물로 사용된다(Songstad et al., 1995 감수).

<72> 유전자 변형에 사용되는 선별 및 리포터 유전자

<73> 형질전환된 세포를 동정하기 위해, 관심의 유전자를 선별할 수 있는 마커 유전자와 결합시킨다. 마커 유전자는 형질전환된 세포를 선별하는 데 필수적인 것이다. 형질전환된 세포/조직의 가시적 특징에 기초하여 선별할 수 있다. 개똥벌레에서 분리된 루시퍼라제 유전자를 예로 들 수 있다. 이러한 유전자를 발현하고 기질(루시퍼린)이 제공된 식물 세포는 특정 장치에 의해 검출할 수 있는 빛을 발산할 것이다(Ow et al., 1986). 형질전환된 조직을 선별하는 다른 방법은 항생제 또는 제초제에 대한 내성을 코딩하는 유전자를 도입시키는 것이다(Thompson et al., 1987; Gordon-Kamm et al., 1990).

<74> 다수의 항생제와 제초제가 식물 형질전환에서 선별제로 사용되어 왔다. 곡류에서, 제초제 포스피노트리신(PR-T)에 대한 내성을 유전자전환 식물의 선별을 위해 선택하였다(Cao et al., 1990). *Carica papaya*(Fitch et al., 1994), *Vitis vinifera*(Nakano et al., 1994, Scorza et al., 1994), 메이즈(Rhodes et al., 1988) 및 벼(Chen et al., 1987)에서, 카나마이신 및 관련 항생제(Fraley et al., 1986)에 대한 내성을 부여하는 네오마이신 포스포탄스퍼라제 (NPTII) 유전자를 선별 가능한 마커로 사용하였다.

- <75> 카사바에는 상기에 언급된 모든 선별 시스템을 사용할 수 있지만, PPT계 선별이 성숙한 배아를 형성하는 FEC의 능력을 개선시키고 식물로 재생력을 증가시킨다는 이점을 가지고 있다.
- <76> 다음은 최근에 고아밀로펩틴 함량을 가진 카사바 식물을 생산하고자 하는 목적으로 카사바 식물을 유전학적으로 변형시키는 방법을 설명하고 있다.
- <77> **카사바 gbss 유전자와 분리 및 식물 형질전환 벡터의 제작**
- <78> 이전의 연구에서, gbss 유전자를 감자 gbss 유전자(Visser et al., 1989)를 프로모터 이용하여 카사바로부터 분리하였다(Salehuzzaman et al., 1993). gbss 유전자를 pUC19에서 감자 gbss 프로모터(Visser et al., 1991)와 노팔린 합성효소 종결자 사이에 안티센스 방향으로 서브클로닝하여, 벡터 pAG61을 유도하였다(Salehuzzaman et al., 1993). 또한, 단백질 합성 연장 인자 1-알파와 같은 다른 바람직한 괴경 특이적 프로모터(Suhandono et al., 2001), 카사바 gbss 또는 CaMV과 같은 좀더 일반적인 프로모터가 gbss와 같은 유전자의 직접 발현에 사용될 수 있다.
- <79> 완전 루시페라제 유전자(BgIII 단편)를 pJIT100(Guerineau et al., 1993)에서 분리하고 pAG61의 BamHI 자리에 삽입하였다. 이것으로 pGBSSaa2 및 pGBSSas7의 상이한 2가지 벡터가 생성되었다. 2가지 벡터사이의 차이점은 서로 루시페라제와 안티센스 gbss 유전자의 방향이다. 2가지 구조체 모두 고아밀로펩틴 함량을 가진 카사바 식물을 성공적으로 생산하였다.
- <80> **사용된 식물 원료 및 조직 배양 배지**
- <81> Murashige와 Skoog(1962) 염 및 비타민 및 40 g/ℓ 수크로오스(MS4)가 강화된 배지 상에서 하나의 노드 절단물을 매월 계대배양하여 유전자형 TMS60444의 식물을 유지시켰다. 층성의 배아발생 유합조직(FEC) 세포주를 다음과 같이 개시시켰다:
- <82> - 공여체 식물로부터 분열조직 또는 미성숙 잎을 분리하고,
 - <83> - 6 mg/ℓ의 NAA 및 6 mg/ℓ Picloram가 강화된 MS40 상에서 분열조직/잎을 배양하고,
 - <84> - 밀집된 배아발생 조직을 분리하여, Gresshoff 및 Day(1974) 염 및 비타민, 60 g/ℓ 수크로오스 및 10 mg/ℓ Picloram(GD6)가 강화된 배지에서 배양하고,
 - <85> - GD6 배지에서 배양된 FEC를 분리하고, FEC를 GD6 배지 상에 3주 동안 계대배양하여 유지시킨다. Schenk 및 Hildebrandt(1972) 염 및 비타민, 60 g/ℓ의 수크로오스 및 10 mg/ℓ의 Picloram(SH6)가 강화된 액상 배지 50 mL를 함유한 200 mL의 플라스크 내로 FEC 0.5 g을 옮겨 액체 배양을 개시하였다. 배지를 1주일에 2회 갈아주고 2주 후에는 각 플라스크의 내용물을 5개의 새로운 플라스크로 나누어 담았다. 플라스크를 회전식 교반기(LAB-line Instruments Inc. Model 3519) 상에서 120 rpm으로 배양하였다.
- <86> **입자상에 DNA 코팅**
- <87> Cabe 등(1988)에 의한 방법을 사용하여 입자상에 DNA를 코팅하였다. 80 µg의 DNA(Promega사의 WizardTM Maxipreps DNA 정제 시스템을 이용하여 분리)를 10 mg의 금입자(1.6 µm, BioRad), 30 µL의 5M NaCl, 5 µL의 2M tris HCl(pH 8.0), 965 µL H2O, 100 µL의 25% PEG 1550, 100 µL의 0.1M 스피미딘 및 50 µL의 2.5M CaCl2와 혼합하였다. 원심분리 후, 펠릿을 10 mL의 무수 알콜에 재현탁하고 간단하게 초음파 처리하였다. 160 µL의 재현탁물을 마크로캐리어 상에 비스듬하게 놓인 마크로캐리어 홀더의 홀에 피펫을 사용하여 넣었다. 5분 후, 마크로캐리어 홀더를 꺼냈다. 금비드의 박막으로 덮인 마크로캐리어를 오른 내에서 건조시키고(10분, 40°C) 충격에 사용하였다.
- <88> **FEC의 충격 및 유전자전환 식물의 선별**
- <89> 적어도 5주동안 액상 SH6 배지내에 배양된 FEC를 채로 걸려(1 mm 메쉬) 수집하였다. FEC 100 mg을 GD6 배지상에 퍼트리고 BioRad PDS-100He biolistic 장치(헬륨압 1100 p.s.i., 디스크 탈장과 마크로 캐리어 사이 및 마크로캐리어와 스텁퍼 플레이트 사이의 0.5 cm 거리, 스텁퍼 플레이트와 FEC 사이의 5.0 cm, 27 인치 Hg 진공)를 사용하여 충격을 가하였다.
- <90> TMS60444 유래의 FEC를 가진 총 212 및 184개의 페트리 디시를 각각 GBSSaa2 또는 GBSSas7 구조체로 각각 충격을 가하였다. 충격후, 충격된 FEC를 액체 SH6배지로 충전된 플라스틱 포트내에서 배양하였다. 2주 후, FEC를 고체 GD6 배지상에서 수집하고 루시페라제 활성을 분석하였다. 각각의 루시페라제(LUC) 스폿을 개별적 세포주

로 계대배양하였다. 총 186개의 1uc 스폽을 GBSS7을 가진 구조체 GBSSas2 및 222에 의해 생산하였다. LUC 활성을 가진 FEC 유닛의 정확하게 위치를 정하는 것이 불가능하고 유전자변형 조직의 손실을 방지하는 것이 불가능하기 때문에, LUC 스폽의 0.5-1 cm 반경 주변 내에 조직을 액상 SH6 배지로 옮겼다. 루시퍼라제 활성이 없는 세포주를 버리고 4개 이상의 스폽을 가진 세포주를 서브클럽프 분할을 위해 사용하였다. 1-3개의 스폽을 가진 세포주를 다시 액상 SH6 배지로 옮기고 2주 후에, 다수의 스폽이 4개 이상으로 증가된 세포주를 서브클럽프 분할에 사용하였고, 다른 것은 버렸다.

<91> pGBSSas2로 충격으로부터 44개의 세포주를 얻고, pGBSSas7로 충격으로부터 40개의 세포주를 얻었다. 유전자변형 조직을 서브클럽프 분할로 칭하여지는 방법(Raemaker et al., 2000)으로 분리하고 정제하였다. 루시퍼라제 양성 스폽 주변(0.5 내지 1cm 지름)의 조직을 계대배양하여 서브클럽프 분할을 시작하였다. 조직을 GD6 배지상에서 가능한 한 세밀하게 분할하였다. 2주 후, 페트리 디시는 FEC 조직의 작은 클럽프로 덮혔다. LUC 양성 클럽프만을 계대배양하였다. 이것을 위해, 클럽프를 서브클럽프로 분할하고 GD6 배지 상에서 배양하였다. 이 선별 과정을 1-2회 이상 반복하고 조직을 식물로 재생시키기 위해 배양하였다. 이것을 위해 84개의 FEC 세포주를 성숙 배지(1 mg/l Picloram으로 부충된 MS4) 상에서 10-12주 동안 매2-3주마다 계대배양하였다. 뇌관 모양의 체세포 배아를 FEC로부터 분리하고 0.1 mg/1BAP가 강화된 MS4에서 배양하여 더욱 성숙시켰다. 성숙한 체세포 배아는 액상에서 우선 2주동안 배양한 후 고체 밀가루 배지(MS4+1 mg/l BAP)에서 배양시켰다. 식물은 MS4 배지에서 뿌리를 내렸다. 식물을 31개의 44GBSSas7 배양된 세포주 및 27개의 40 GBSSas7 배양된 세포주에서 얻었다. 이들 식물을 우선 8% 수크로오스가 강화된 Murashige 및 Skoog 배지에서 우선 성장시켜 카사바 식물의 줄기에 전분을 축적시켰다(Salehuzzaman et al., 1994). 아밀로즈/아밀로펙틴 비율을 실험실내에서 Lugol 용액(I2:KI)으로 중점된 줄기의 교차점을 요오드 염색하여 가시화하였다. 염색된 줄기부를 현미경으로 관찰하였다. 총 9개의 세포주(GBSSas2에서 3개 및 GBSSas7에서 6개)에서 변경된 염색 패턴을 가진 식물을 생산하였고, 이것은 상기 식물이 줄기에서 변화된 전분 조성을 가졌다는 것을 의미한다. 이들 식물을 온실로 옮겨 과경을 형성하도록 하였다. 3개월 후, 뿌리의 껍질을 벗겨 저장 뿌리의 중심부를 소량의 Na₂S₂O₅를 함유한 물에서 실험실 블랜더에서 갈았다. 슬러리를 전분 분리를 위해 Sanamat로 이동하였다. 물-전분 과립 혼탁액을 원심분리관으로 이동시켜 원심분리하였다. 전분을 20°C에서 3일간 건조시켰다.

<92> 아밀로펙틴/아밀로즈 함량을 Hovenkamp-Hermelink et al.(1988)에 의해 기재된 방법으로 측정하였다.

<93> 총 2개의 세포주(하나는 GBSSas2 및 다른 하나는 GBSSas7)가 양 테스트에서 고아밀로펙틴 함량을 가진 식물을 제공하였다. 1년 후, 동일 식물을 다시 온실로 이동하였다. 2가지 세포주의 총 30개의 식물의 전분을 요오드 염색 및 분광분석법으로 분석하였다. 모든 식물은 고아밀로펙틴의 전분을 가졌다. 동시에, 전분을 3000개 이상의 식물로부터 전분을 분리하여 3군대의 상이한 실험실에서 분석하였으나, 역시 고함량의 아밀로펙틴을 가진 전분이 나타났다.

94> 물질 및 방법

95> 샘플

<96> 타피오카 전분 대조군 샘플

<97> 아밀로펙틴 타피오카 전분 Wageningen사 제조의 AFC3KD

<98> 감자 전분 Oostermoer 1998

<99> 아밀로펙틴 감자 전분 Oostermoer 1996

<100> 옥수수 전분 Meritena A

<101> 밀랍성 옥수수 전분 Meritena 300

102> 방법

103> 질소 함량(N_{total})

<104> ISO 5378(1978), 전분 및 유도 산물 - 케달법(Kjedahl method)에 의한 질소 측정 - 분광광도법.

105> 입자 크기 분포

<106> 입자 크기는 Coulter 보정 표준 P.D.V.B. Latex 로트 F.34로 보정된 Coulter Multisizer II를 이용해 측정한다 (직경 측정 튜브 140μm, 측정 클래스의 수 256, 측정 범위 3,1-107,7 μm(감자) 및 2,8-82.0 μm(기타 전분)).

샘플을 염 등장액(DiluidTM 아지드 프리, J.T. Baker)에서 혼탁하고 초음파조(Branson 5510) 내에서 균질화한다.

<107> 시차주사 열량법

Perkin-Elmer DSC-7을 이용하여 시차주사 열량법 실험을 수행한다. 적어도 10 mg의 전분 및 40 mg의 탈염수를 스테인리스 스틸 DSC-팬에 넣고 전분의 수분 함량을 고려하여 80%의 수분함량을 얻는다. DSC-팬을 밀폐하여 밀봉하고 하나를 실온에서 하룻밤 동안 저장하여 평형화시킨다. 다음날, 샘플을 10°C/분의 속도로 5°C에서 130°C로 가열한다.

<109> 건조 물질 함량

ISO 1666(1997), 전분 및 유도 산물 - 수분 함량의 측정 - 오븐 건조법.

<111> 회분 함량(IV)

고유 점도는 H.W. Leach in Cereal Chemistry, vol. 40, pg595(1993)에 기재된 바와 같이, 용매로서 1M의 수산화나트륨을 이용하고 Ubbelohde 점도 측정기를 이용하여 공지된 방식으로 측정하여 g/dL 단위로 나타낸다.

<113> 인 함량(P)

ISO 3946(1982), 전분 및 유도 산물 - 전체 인 함량의 측정 - 분광광도법.

<115> 점도 동향

Newport Scientific사 제조의 Rapid Visco Analyser(RVA)를 이용해 측정. 400 rpm에서 탈염수 중의 6% 농도에서 90°에서 5분간 측정하고, 분단 14°의 속도로 30°로 냉각한다.

<117> 사슬 길이 분포

이소아밀라아제를 이용해 아밀로펩틴 전분의 가지를 제거하고, 얻어진 선형의 알파-1,4-말토-올리고사카라이드를 펄스 전류 검출 시스템을 이용하는 고성능 음이온 교환 크로마토그래피를 이용해 측정한다.

<119> 결과

결과는 하기의 표에 나타낸다.

표 1: 사슬 길이 분포(중량 평균)

	카사바	아밀로펩틴 카사바	메이즈	밀립성 메이즈	감자	아밀로펩틴 감자
DP 6 t/m 9	4.1 (5.9)	4.6 (5.7)	2.4 (3.9)	3.3 (3.7)	2.1 (3.7)	2.6 (3.9)
DP 6 t/m 12	14.7 (21.7)	16.4 (20.4)	11.2 (18.2)	15.3 (17.0)	7.6 (13.5)	9.5 (14.1)
DP 13 t/m 24	31.9 (46.6)	36.9 (46.0)	33.2 (54.0)	46.2 (51.4)	29.2 (51.7)	33.3 (49.4)
DP 25 t/m 40	14 (20.4) (21.8)	17.5 (21.8)	13 (21.1) (21.4)	19.2 (21.4)	12.6 (22.3)	14.9 (22.1)
DP >40 회수율 (%)	7.8 (11.4) (100)	9.4 (11.7) (100)	4.3 (7.0) (100)	8.9 (9.9) (100)	7.4 (13.1) (100)	9.8 (14.5) (100)
	68.5 (100)	80.2 (100)	61.5 (100)	89.9 (100)	56.5 (100)	67.4 (100)

<122>

<123>

표 2: 각종 파라미터

파라미터	밀립성 메이즈	아밀로펙틴 카사바	아밀로펙틴 감자	특성 ACS
	(AOS)	(APS)		
RVA				
Tg	62.3 °C	61.7 °C	63.3 °C	아밀로펙틴 전분-낮은 Tg
Tg - Ttop	10.0 °C	5.9 °C	5.8 °C	급속 용해
Ttop visco	75 RVU	112 RVU	171 RVU	
Tend visco	48 RVU	87 RVU	77 RVU	
Brabender				
Tg	66 °C	60.5 °C	61.5 °C	아밀로펙틴 전분-낮은 Tg
Tg - Ttop	6.5 °C	6 °C	7 °C	급속 용해
Ttop visco	685 BU	990 BU	1560 BU	
T20'90	250 BU	290 BU	440 BU	
Tend visco	400 BU	495 BU	670 BU	
아밀로오스 함량				
점도 안정성	< 1%	< 1%	< 1%	전분, 겹출 수준
단백질	안정	안정	안정	차이 없음
	0.41 mg/g	0.16	0.10	투명한 용액
포스페이트				
	< 0.05 mg/g	0.06	0.81	투명한 용액,
사슬길이	mg/g	mg/g	mg/g	
분포	21	27	28	점도 수준

<124>

<125>

표 3: 점도 파라미터

	건조 물질 mg/g	회분 mg/g ds	N _{total} mg/g ds	P mg/g ds	IV dl/g ds
타피오카	860	3.5	0.11	0.06	2.4
아밀로펙틴	863	2.3	0.16	0.06	1.7
타피오카					
감자	844	4.7	0.13	0.85	2.4
아밀로펙틴 감자	856	4.7	0.10	0.81	1.8
메이즈	879	1.1	0.53	0.18	1.7
밀립성 메이즈	881	<1.0	0.41	<0.05	1.6

<126>

<127>

표 4: 입자 크기 분포

종량 평균	d ₁₀	d ₅₀	d ₉₀
	μm	μm	μm
타피오카	13.0	7.8	12.6
아밀로펙틴	14.0	7.7	13.0
타피오카			
감자	42.9	23.0	42.4
아밀로펙틴 감자	45.0	23.2	44.7
메이즈	14.0	9.8	14.1
밀립성 메이즈	14.3	9.3	14.0

<128>

<129> 표 5: DSC에 의해 측정된 젤화 동향의 결과

	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	T_{end} (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
타피오카	60.2 ± 0.4	65.0 ± 0.6	72.8 ± 0.7	12.6 ± 0.3	19.19 ± 1.2
아밀로펙틴 타피오카	61.7 ± 0.3	67.6 ± 1.0	75.9 ± 0.6	14.2 ± 0.4	19.11 ± 2.2
감자	62.6 ± 0.3	67.3 ± 0.6	75.1 ± 0.9	12.5 ± 0.6	22.12 ± 2.7
아밀로펙틴 감자	63.3 ± 0.3	69.1 ± 0.4	75.2 ± 0.6	11.9 ± 0.5	24.04 ± 1.4
메이즈	67.4 ± 0.2	73.2 ± 0.3	79.3 ± 0.9	12.1 ± 0.9	15.92 ± 0.6
밀립성 메이즈	62.3 ± 0.3	72.3 ± 0.3	80.4 ± 0.2	18.1 ± 0.4	18.76 ± 0.8

<130> <131> 밀립성 메이즈 전분과 비교한 아밀로펙틴 카사바 전분의 상이한 특성:

<132> - 낮은 Tg

<133> - 전분의 신속한 용해(겔화 온도 및 최고 온도 사이의 차이)

<134> - 약 20% 높은 점도

<135> - 단백질 함량 낮음, 불순물 수준 낮음.

<136> <137> 아밀로펙틴 감자 전분과 비교한 아밀로펙틴 카사바 전분의 특성:

<138> - 다소 낮은 Tg(< 1C)

<139> - 전분의 신속한 용해, 그러나 APS 점도는 높음(델타 C = 6C -BU = 1400)

<140> - 약 30% 낮은 점도 수준

<141> - 작은 과립

<142> <143> 표 6: 체세포 배아발생에 사용된 카사바의 유전형

인도네시아	나이지리아	TMS90353	M. Co122,	상파울로
Adira 1	TMS50395	TMS30555	짐바브웨	타이
Tjurug	TMS60444	TMS30211	Line 11	R5
Adira 4	TMS90059	TMS30395	M7	KU50
Mangi 4	TMS30572	TMS30001	베네수엘라	R60
Gading	TMS4(2)1244	콜롬비아	M.Ven77	R90
Faroka	TMS60506	M. Col 1505	브라질	R1

<144> 표 7: 성숙한 배아의 성형과 반응하는 잎 외식편의 개수 및 배양 잎 외식편당 성숙한 배아의 개수(# ME/CLE)에 대한 시험관내 공여체 식물의 성장기 동안의 광도의 영향

광도 ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)	외식편의 개수	이식체 반응	생산 (# ME/CLE ^b)
40	48	18 b	1.7 b
28	48	26 ab	4.9 ab
8	48	31 a	6.6 a

<145>

^{a, b}는 동일한 문자로 개별적인 카이-제곱 테스트($p<0.1$) 및 LSD 테스트($p<0.1$)에 의해 유의하지 않은 차이를 나타냄을 의미한다.

<147>

표 8: 1차 성숙한 배아의 생산(시험관 식물로부터 분리된 배양 잎 외식편당 성숙한 배아의 개수), 그리고 이어서 11개의 나이지리아 카사바 유전형 및 *M. Col22*에서 2차 체세포 배아발생에 의한 성숙한 배아의 증식에 대한 2,4-D 사전처리의 영향

배발생 2,4-D 사전처리	1차 ^{a)}		2차 ^{b)}
	no	yes	
<i>M. Col22</i>	3.5	9.4	13.5
TMS 30555	0	0.7	6.2
TMS 50395	0	< 0.1	5.3
TMS 60506	0	< 0.1	0
TMS 90059	0	< 0.1	7.2
TMS 30211	0	0	-
TMS 60444	0	1.1	9.9
TMS 30395	0	0.1	6.7
TMS 90853	< 0.1	0.2	8.2
TMS 4(2)1244	< 0.1	0	5.4
TMS 30001	0	0	-
TMS 30572	0	0	-

^{a)} 3개 실험의 평균(총 48-74 잎 외식편), ^{b)} 2개 실험의 평균(총 24-48 ME 외식편).

<148>

따라서, 본 발명은 또한 천연 또는 가지 제거된 아밀로펙틴 카사바 (타피오카) 전분 모두와, 그러한 전분을 함유하는 조성물을 포함한다. 상기 전분은 화학적 변형을 가하거나 가지 않은 상태로 다양한 식품, 약제 및 산업 용도로 유용하다.

<151>

본 명세서에 사용된 아밀로펙틴 전분이란 보통 카사바 전분의 아밀로펙틴 함량보다 실질적으로 높은 아밀로펙틴 함량, 특히 적어도 90 중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 95 중량%, 가장 바람직하게는 적어도 약 98 중량%의 아밀로펙틴 함량을 가지는 전분 및 녹말을 의미한다.

<152>

아밀로펙틴 카사바 전분은 상기의 FEC 방법을 통해 얻을 수 있다. 천연에서 발견될 수 있는 아밀로펙틴 카사바 식물로부터 유래되거나, 또는 표준 육종법 및 교차육종법에 의해 얻어지거나, 유전자의 전좌, 역위, 형질전환 또는 기타 방법 또는 이를 변종을 포함하도록 하는 염색체 조작에 의해 얻어지는 아밀로펙틴 카사바 전분도 본 발명에 포함되며, 이렇게 하여 본 발명의 전분의 특성이 얻어진다. 또한, 인공 돌연변이 및 돌연변이 육종의 공지된 표준 방법에 의해 생산된 상기 조성의 변종들로부터 성장한 식물로부터 추출한 전분도 본 발명에 적용 가능하다.

- <153> 실질적으로 순수한 전분은 아밀로펙틴 카사바 식물의 뿌리로부터 추출할 수 있다. 추출은 비제한적으로 뿌리의 마쇄 및 수추출에 의해 잔류 성분으로부터의 전분 분리를 포함하는 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다.
- <154> 아밀로펙틴 카사바 전분은 낮은 수준의 아밀로오스 및 높은 수준의 아밀로펙틴을 함유한다. 아밀로펙틴 카사바 전분은 또한 보통의 카사바 전분보다 높은 점도, 특히 보통 카사바 전분의 적어도 약 30% 이상, 보다 구체적으로는 적어도 50% 이상, 특히 적어도 약 80% 이상 높은 점도를 갖는다. 특히 적합한 아밀로펙틴 카사바 전분은 이하의 실시예 3의 a에서의 방법을 이용하여 급속 점도 분석기에 의해 측정하는 경우 적어도 약 1200, 보다 구체적으로는 적어도 약 1300의 피크 점도를 갖는 것들이다.
- <155> 얻어지는 천연 전분은 다양한 용도에 바람직하고 독특한 특성 및 기능을 갖는다. 그러한 천연 전분은 화학적 변성 없이 원하는 기능을 달성하는 부가의 이점이 있다. 그러나, 본 발명의 전분은 그들의 특성 및 기능을 더욱 향상시키기 위해 변성될 수도 있다. 당 기술분야에 공지된 임의의 변성이 사용될 수 있으며, 이러한 변성법으로는 화학적, 물리적 또는 효소적 변성이 포함된다.
- <156> 화학적 유도에는 에테르, 에스테르 또는 하프 에스테르, 예를 들면 하이드록시알킬 에테르, 아세테이트, 포스페이트, 숙시네이트, 즉 옥테닐 숙시네이트, 3급 및 4급 아민 에테르 등을 형성하는 것들이 포함될 것이며, 당 기술분야에 공지된 임의의 다른 변성법에 의해서 이루어질 수도 있을 것이다.
- <157> 본 발명의 전분의 화학적 변성은 가교결합을 포함한다. 비제한적으로 에피클로로하이드린, 선형 디카르복시산 무수물, 시트르산 아크릴레인, 포스포리스 옥시클로라이드, 아디프산/아세트산 무수물, 트리메타포스페이트염, 포름알데하이드, 시안우르산 클로라이드, 디이소시네이트 및 디비닐 셀론을 포함하는 당 기술분야에 공지된 임의의 가교결합제가 이러한 목적으로 활용될 수 있다.
- <158> 본 발명의 전분은 WO 95/04082(1995년 2월 9일 공개됨)에 기재된 열 억제 또는 전단과 같은 방법에 의해 물리적으로 변성될 수 있다.
- <159> 본 발명의 전분은 비제한적으로 알파-아밀라아제, 베타-아밀라아제, 글루코아밀라아제, 이소아밀라아제 및 페놀란아제를 포함하는 당 기술분야에 공지된 하나 이상의 효소에 의해 효소적으로 변성시킬 수도 있다.
- <160> 전분을 사전 젤라틴화할 수도 있다. 사전 젤라틴화 전분의 제조 방법의 예는 U.S. 4,280,851(Pitchon 외), U.S. 4,465,702(Eastman 외), U.S. 5,037,929(Rajagopalan), U.S. 5,131,953(Kasica 외) 및 U.S. 5,149,699(Rubens)에 기재되어 있다. 전분을 사전 젤라틴화하는 종래의 방법은 당업자들에게 잘 알려져 있으며, 다음과 같은 논문에도 제시되어 있다: Chapter XXII - "Production and Use of Pregelatinize Starch", Starch: Chemistry and Technology, Vol. III - Industrial Aspects, R.L. Whistler 및 E.F. Paschall 편저, Academic Press, New York 1976.
- <161> 상기 전분은 산화, 특히 α-아밀라아제에 의한 효소 전환, 산 가수분해 또는 열 및/또는 산 텍스트린화에 의해 제조되는 유동성 또는 저점도 전분으로 전환될 수도 있다.
- <162> 본 발명의 전분은 당 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 정제하여 천연 전분 자체의 것이거나 전분 변성 과정 동안 생성된 냄새 및 색깔을 제거할 수 있다.
- <163> 당업자는 원하는 전분 특성 및 기능을 얻기 위하여 단일 또는 조합된 변성법을 이용할 수 있다. 이들 방법은 당 기술분야에 공지되어 있으며, 얻어지는 전분 특성 및 기능은 활용된 변성의 유형, 변성 정도 및 반응 조건에 따라 가변적일 것이다.
- <164> 본 발명의 아밀로펙틴 카사바 전분을 이용하여 얻을 수 있는 기능으로는 비제한적으로 유화, 증점(thickening) 및 점질화(viscosifying), 젤화 및 필름 형성이 포함된다.
- <165> 본 발명의 아밀로펙틴 카사바 전분은 비제한적으로 종이 제품, 식품, 약품 및 영양 제품, 개인 위생 용품 및 기타 산업 용품을 포함하는 각종 산업 분야에 사용될 수 있다.
- <166> 종이 제품은 비제한적으로 종이, 페이퍼보드, 라이너보드, 골판지, 카보드, 백 및 포장지를 포함한다.
- <167> 식품은 식용품을 의미하는 것으로서, 비제한적으로 시리얼, 빵 및 빵 제품, 치즈 및 모조 치즈 제품, 조미료, 과자류, 부어 먹는 드레싱 및 떠먹는 드레싱을 포함하는 드레싱, 파일 및 크림 필링을 포함하는 파이 필링, 화이트 소스 및 치즈 소스와 같은 유제 소스를 포함하는 소스, 그레비에, 모조 및 라이트(lite) 시럼, 푸딩; 카스

타드, 요거트, 소어 크림, 파스타, 유제 음료를 포함하는 음료, 글레이즈, 수프 및 유아용 식품을 포함한다.

<168> 약품 및 영양 제품에는 약제용 부형체, 비등성 정제를 포함하는 정제, 산분(dusting) 전분 및 분말, 그리고 선생물 제품이 포함된다.

<169> 개인 보호 용품에는 비제한적으로 테오드란트 및 발한 방지제, 스프레이, 젤, 무스, 로션 및 포마드를 포함하는 모발 고정제, 비누 및 클린저, 아이샤도우, 파우더, 파운데이션 및 볼연지를 포함하는 메이크업, 샴푸 및 컨디셔너, 그리고 구강 세정제, 구취 제거제 및 치약이 포함된다.

<170> 기타 산업 용품으로는 비제한적으로 세제, 그리고 루스필, 시트 및 쉐이프를 포함하는 생분해성 발포 제품이 포함된다.

<171> 아밀로펙틴 타피오카 전분은 일반적으로 원하는 어떠한 수준으로도 사용될 수 있으며, 함량은 얻어질 기능에 따라 결정된다. 일반적으로, 아밀로펙틴 카사바 전분은 제품의 약 1 중량% 내지 약 95 중량%, 구체적으로는 약 5 중량% 내지 약 60 중량%, 보다 구체적으로는 약 10 중량% 내지 약 40 중량%의 함량으로 사용될 것이다.

실시예

<173> 하기 실시예들은 본 발명을 추가 예시하고 설명하기 위한 것으로서, 어떠한 의미에서도 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다. 사용된 모든 백분율은 중량/중량을 기준으로 한다.

<174> 하기 실시예에서, 사용된 타피오카 샘플들은 다음과 같다:

<175> 카사바 1 = 타이에서 재배되고 National Starch and Chemical Company사(Bridgewater, NJ, USA)에 의해 시판되는 보통의 카사바 전분.

<176> 카사바 2 = 인도네시아에서 재배되고 Avebe B.A(Foxhol, The Netherland)에 의해 시판되는 보통의 카사바 전분.

<177> ACS 1-3 = 안티센스 방식으로 GBSS 유전자를 도입하고 카사바 식물이 재생되는 FEC를 이용하여 유전적으로 생산한 아밀로펙틴 카사바 전분.

<178> 감자 = Avebe B.A(Foxhol, The Netherland)에 의해 시판되는 보통의 감자 전분.

<179> AMF 감자 = Avebe B.A(Foxhol, The Netherland)에 의해 시판되는 저아밀로오스 감자 전분.

<180> 옥수수 = National Starch and Chemical Company사(Bridgewater, NJ, USA)에 의해 시판되는 보통의 옥수수 전분.

<181> 밀립성 = National Starch and Chemical Company사(Bridgewater, NJ, USA)에 의해 시판되는 밀립성(저아밀로오스) 옥수수 전분.

실시예 1 - 아밀로오스 함량

<183> a. 아밀로오스 함량은 전위차 적정을 통해 측정하였다. 대량 0.5 g의 전분 샘플을 10 ml의 진한 염화칼슘(약 30 중량%) 중에서 30분 동안 90°C로 가열하였다. 샘플을 실온으로 냉각하고, 5 ml의 2.5% 우라닐 아세테이트 용액으로 희석하고, 잘 혼합한 뒤, 2000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이어서, 샘플을 여과하여 투명한 용액을 얻었다.

<184> 전분 농도는 1 cm 편광계 세포를 이용하여 평광측정을 통해 측정하였다. 이어서, KCl 참조극을 가지는 플라티늄 전극을 이용하여 전위를 기록하면서 샘플의 일부(보통 5 ml)를 표준화된 0.01 N의 요오드 용액으로 직접 적정하였다. 굴절점에 도달하는 데 소요되는 요오드의 양을 결합된 요오드로서 직접 측정하였다. 1.0 g의 아밀로오스가 200 mg의 요오드와 결합할 것으로 추정하여 아밀로오스의 함량은 계산하였다.

<185> 편광 적정의 결과를 표 9에 나타내었다.

<186>

표 9

기재 전분	아밀로오스 함량 (%)
카사바 1	20%
카사바 2	17.4%
ACS 1	2.0%
ACS 2	2.8%
ACS 3	2.7%

<187>

<188>

표 9로부터 결정할 수 있는 바와 같이, 아밀로펩틴 카사바 전분은 보통의 카사바 전분보다 현저히 낮은 함량의 아밀로오스를 함유한다.

<189>

b. 아밀로오스 함량은 젤투과 크로마토그래프(GPC)를 이용해 측정하였다. 샘플은 4 내지 8 mg의 전분을 5 mM의 질산나트륨을 함유하는 4 g의 디메틸셀록사이드(DMSO) 중에 슬러리화하고, 100°C에서 2시간 동안 가열하여 준비하였다. 필요한 경우에는 샘플을 여과하고 140C 크로마토그래프(Waters Corporation, Amherst, MA)로 주입하였다. 젤투과 크로마토그래프에는 4개의 칼럼(카드 칼럼, 10^5 , 10^3 , 10^2 미크론 (기명) 다공 크기 칼럼, 모두 Polymer Laboratories사(Amherst, MA) 제품)을 이용하였다. 이동상은 5mM 질산나트륨을 함유하는 디메틸셀록사이드였다. 기구는 80°C의 온도에서 작동되었으며, 0.7 mL/분의 유속이 사용되었다. 칼럼은 풀란 표준 (Showa Denko K.K., Japan)을 이용해 5800에서 850,000의 범위로 보정하였다. 도 2는 보통 및 아밀로펩틴 카사바 전분의 GPC에 의한 상대 분자량 분포를 나타낸 것이다. 도면으로부터 결정할 수 있는 바와 같이, 3개의 아밀로펩틴 카사바 전분은 약 6.83의 상대 log(분자량)에서 피크에 의해 나타난 바와 같은 현저히 높은 아밀로펩틴을 함유한다. 또한, 이는 유일한 주된 피크이다. 반면, 보통의 전분들은 각각 약 6의 상대 log(분자량)에서 부가의 아밀로오스 피크를 나타내었다.

<190>

실시예 2 - 구조

<191>

본 실시예에서는 다음과 같은 절차를 통해 가지 제거를 수행하였다. 20 mg의 전분을 2 mL의 90% DMSO(10% 물)에 첨가하고, 용해될 때까지 (90°C에서) 교반하였다. 7,980 mL의 mM 아세테이트 완충액(pH 4.8)을 유리병에 첨가하고 교반하였다. 용액으로부터 다소의 아밀로오스가 침전된 경우에는 용액이 투명해질 때까지 간단히 끓인다. 샘플이 완전히 용해되었을 때, 20 μL의 순수한 이소아밀라아제를 첨가하였다. 유리병을 38°C 하의 항온조에서 16시간 동안 배양하였다. 종결 시, 사슬 길이 분포 평가를 위하여 피펫을 이용해 1mL의 샘플을 2 mL의 유리병에 첨가했다. 샘플 잔류물을 50 mL의 아세톤에 침전시켰다. 0.2 미크론의 나일론 필터 페이퍼를 이용해 침전된 물질을 여과해 수집하고 GPC를 위해 준비하였다.

<192>

이상적으로는, b 단락이 a 단락 전에 와야 한다. 가지 제거된 아밀로펩틴(a)의 구조는 전체 가지 제거된 전분의 크로마토그램(b)을 수행한 뒤, 아밀로펩틴 피크만을 적분하여 얻는다.

<193>

a. 고아밀로오스 및 보통의 타피오카 전분의 가지 제거된 아밀로펩틴의 분자량 분포는 실시예 1의 b와 같이 GPC를 이용하여 측정하였다. 도 3은 카사바 전분의 가지 제거된 아밀로펩틴의 얻어진 분자량 분포를 나타낸 것이다. 여기에 나타난 바와 같이, 아밀로펩틴 구조는 다른 카사바 전분의 구조와 실질적으로 동일하다.

<194>

b. 가지 제거 아밀로펩틴 및 보통의 카사바 전분의 분자량 분포를 상기 a 단락에서와 같이 측정하였다. 도 4는 카사바 전분의 얻어진 분자량 분포를 나타낸 것이다. 도 4는 아밀로펩틴 구조가 유사하지만, 약 3.0 및 4.0에서 실질적으로 동일한 (상대) log(분자량) 피크에 의해 매우 높은 양으로 존재함을 보여준다. 또한, 도 4는 약 5.81에서 (상대) log(분자량) 피크의 결여에 의해 입증된 바와 같이, 아밀로펩틴 카사바 전분에 아밀로오스가 실질적으로 존재하지 않음을 나타낸다.

<195>

실시예 3 - 점도

<196>

a. 점도는 RVA 시리즈 4의 급속 점도 분석기(Newport Scientific, New South Wales, Australia)를 이용해 측정하였다. 건조 중량을 기준으로 5%의 전분을 함유하는 슬러리를 준비하고, 3.0°C·분의 속도로 50°C에서 95°C로 가열하였다. 이어서, 샘플을 95°C에서 5분간 유지하였다. 끝으로, 60°C/분의 속도로 샘플을 35°C로 냉각하였다. 점도 측정은 160 rpm에서 이루어졌으며, 결과(피크 점도)를 하기 표 10에 나타내었다.

<197>

표 10

<u>기재 전분</u>	<u>점도 (RVA 단위)</u>
카사바 1	600
카사바 2	1015
ACS 1	1230
ACS 2	1360
ACS 3	1330

<198>

표 10에 나타난 바와 같이, 아밀로펩틴 카사바 전분은 인도네시아의 보통 카사바 전분보다는 약 30% 이상으로 현저히 높은 피크 점도를 나타내었으며, 타이의 보통 카사바 전분보다는 약 2배 이상으로 현저히 높은 피크 점도를 나타내었다.

<200>

b. Visco/amylo/graph, 모델 VA-1A(C.W. Brabender Instrument Co., Hackensack, NJ, USA 07606)을 이용해 점도를 측정하였다. 건조 중량을 기준으로 5%의 전분을 함유하는 슬러리를 준비하고 시트르산/트리소듐 시트레이트 완충용액을 이용해 pH를 3으로 조절하였다. 총 460 g의 충전 중량을 1.5°C/분의 속도로 50°C에서 92°C로 가열하였다. 이어서 슬러리를 92°C에서 30분간 가열하였다. Visco/amylo/graph 중에서 페이스트를 가열하면서 고온 점도를 측정하고, 얻어진 점도 프로필을 도 5에 나타내었다. 도 5는 아밀로펩틴 카사바 전분이 보통의 카사바 전분보다 높은 피크 점도를 가짐을 나타낸다.

<201>

실시예 4 - 젤라틴화 온도

<202>

a. 젤라틴화 온도는 시차주사 열량법을 이용해 측정하였다. 전분 샘플을 2:1의 물:전분의 비율로 10°C/분의 속도로 가열하여 5°C에서 140°C에서 주사하였다. 같은 과정을 반복하고 평균을 기록하였다. 결과를 표 11에 나타내었다.

<203>

표 11

<u>기재</u>	<u>개시 (°C)</u>	<u>피크 (°C)</u>	<u>종결 (°C)</u>	<u>ΔH (J/g)</u>
카사바 1	62.6±0. 4	69.0±0. 3	81.0±0. .1	16.05±1. 00
카사바 2	56.7±0. 1	63.2±0. 2	72.9±0. .3	16.01±0. 43
ACS 1	58.1±0. 1	65.7±0. 0	74.5±0. .0	17.80±0. 80
ACS 2	58.6±0. 0	65.5±0. 2	75.6±0. .3	18.08±0. 36
ACS 3	58.6±0. 0	65.4±0. 0	74.5±0. .1	17.71±0. 20

<204>

표 11에 나타난 바와 같이, 3개의 아밀로펩틴 전분 모두는 타이의 보통 카사바 전분보다는 다소 높은 개시 젤라틴화 온도를 나타내었으며, 인도네시아의 보통 카사바 전분보다는 다소 낮은 개시 젤라틴화 온도를 나타내었다. 3개의 아밀로펩틴 카사바 전분 모두 보통의 카사바 전분보다 높은 젤라틴화 엔트로피를 나타내었다.

- <206> b. 개시 젤라틴화 온도는 실시예 3의 b에서의 방법을 이용하여 Brabender를 통해 체크하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 아밀로펩틴 카사바 전분의 개시 젤라틴화 온도는 보통의 타이 카사바보다 낮았다.
- <207> 인용 문헌
- <208> Anonymus, 1985, CIAT; Annual report: Centro International de Agricultura Tropical, Cali, Columbia. Pp. 197-217.
- <209> Anthony, P., Davey, M.R., Power, J.B., 9.d Lowep X.C. 1995, An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplasts. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 42, 229-302.
- <210> Buiteveld, J. and Creemera-Molenaar, J. 1994. Plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures of leek: (*Allium ampeloprasum* L.). Plant Science, 100, 203-210.
- <211> Cao, J., Duan, X., McElroy, D., and Wu, R. 1990, Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension Culture cells, Plant Cell Rep. II: 586-591.
- <212> Chang, Y.F., Wang, W.C., Colleen, Y.W., Nguyen, H.T., and Wang, JR, 1991. Plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell cultures of wheat (*Triticum aestivum*), Plant Cell Rep. 9: 611-614.
- <213> Chan, W.H., Davey, M.R., Power, J.B., and Cocking, B.C, 1988. Sugarcane protoplasts: factors affecting division and plant regeneration, Plant Cell Rep. 7: 344-347.
- <214> Chen, W.H., Gartland, K.M.A., Davey, M.R., Sotak, R., Gartland, J.S., Mulligan, B.J., Power, J.B. and Cocking, E.C. 1987. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimeric gene. Plant Cell Rep. 6:297-301.
- <215> DeLaat, A., and Blaas, J., 1987, An improved method for protoplast microinjection suitable for transfer of entire plant chromosomes, Plant Sci. 50: 161-169.
- <216> Fitch, M.M.M., Pang, S.Z., Slichton, Lius. S., Tennant, P., Manshardt, R.M., and Gonsalves, D, 1994. Genetic transformation 4-% *Carica papaya*(Papaya). In: Bajai(Eds). Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 29. Plant protoplasts and genetic engineering V. Springer-Verlag, Berlin, P-237-256.
- <217> Dons, J.J.M., and Bouwer, R. 1986. Improving the culture of cucumber protoplasts by using an agarose-disc procedure, Proceedings of an international symposium on nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. Jointly organized by the International Atomic Energy Agency and the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Held in Vienna, 19-23 August 11085, P: 498-604.
- <218> Fraley R.T., Rogers S. G., and Horsh, R.B. 1986, Genetic transformation in higher plants. CRC Critical reviews in Plant Sciences 4(I): 1-46.
- <219> Gordon-Kamm, W.J., Spencer, TM, Mangano, M.R., Adams, T.R., Daines, R.J., Williaim, O.S., OBrien, J.V., Chambers, S.A. Adams, Jr, W.R., Willetts, N.G., Rice, T.B., Mackey C.J., Krueger, R.G., Kausch, A.P. and Lemaux P.G. 1990, Transformation of maize Cells and regeneration of fertile transgenic plants, The Plant Cell, 2:603-618.
- <220> Gresshoff, P.M., and Doy, C.H. 1974. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*(tomato), Planta 107: 161-170.
- <221> GriesbaQh, R. J., and Hammond, J. 1993. Incorporation of the GUS gene into orchids via embryo electrophoresis. Acta, Hort. 336:165-169.
- <222> Guerineau F. & Mullineaux P.M. 1993, Plant transformation and expression vectors. In: Croy R,R.D. (ed,), Plant Mol Biol. Labfax, Biol. S Scientific publishers, Oxford, UK. 1993, pp. 121-148.
- <223> Horn, M.E., Shillito, R.D., Conger, B.V., and Harms, C.T. 1988, Transgenic plants of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts, Plant Cell Rep. 7: 469-472.

- <224> Hovenkamp-Hermelink, JHM, De Vries JN, Admase P, Jacobsen E, Withold B, Feenstra WJ, 1988. Rapid estimation of the amylose/amyllopectine ration in small amounts of tuber and leaf tissue of potato, Potato Res. 31: 241-246.
- <225> Jones H., Tempelaar M. J., and Jones, M.G.K. 1987, Recent advances in Plant Electroporation, Oxford Surveys of Plant Mol. and Cell Biol. 4: 347-357.
- <226> Kaeppler, H.F., Gu, W., Somres, D.A., Rines, H.W., Cockburn, A.F. 1990, Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cell, Plant Cell Rep. 8: 415-418.
- <227> Klein T.M., Kornatein L., Sanfords J.C., and Fromm M.E. 1989, Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. Plant Physiol. 91:440-444.
- <228> Konaa N.K., Sangwan R.S., and Sangwan-Norre, 1994. Nodal Axillary meristems as target tissue for shoot production and genetic transformation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Second International Scientific Meeting of Cassava Biotechnology Network 11, Bogor, Indonesia, p:276-288.
- <229> Kyozuka, J., Otoo; E., and Shimamoto, K. 1988. Plant regeneration from protoplasts of indica rice,. genotypic differences in Culture respond. Theor. Appl. Genet. 76: 887-890.
- <230> Lorz, H., Baker, B., and Schell, J. 1985, Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. Mol. Gen. Genetic 199: 178-182.
- <231> Luong, H.T., Shewry, P.R., and Lazzeri, P.A. 1994. Gene transfer to cassava somatic embryos via tissue electroporation and particle bombardment. In: Second International Scientific Meeting of Cassava Biotechnology Network 11. Bogor. Indonesia. p:303-314.
- <232> Mathews, H., Carcamo, R., Chavarriaga, Schopke, C.P., Fauquet, C. and Beachy, R.N., 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava, Plant Cell Rep, 12:328-333.
- <233> Mroginski and Scocchi, 1992, Somatic embryogenesis of Argentine cassava varieties. In: Roca, W.M., and Thro, A.M. (Eds). Proceedings First Scientific Meetng of the Cassava Biotechnolgy Network. Canagena, Colombia 25-28 August 1992. P:175-179.
- <234> Mukherjee, A, 1994. Embryogenesis and regeneration from cassava of anther and leaf. The Cassava Biotechnology Network. Proceeding of the Second International Scientific Meeting. Bogor, Indonesia, 22-26 Auagust 1994 P:375-377.
- <235> Murashige, T., and Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. Physiol. Plantarum 15 473-497.
- <236> Nakano, M., Hoshino, Y., and Mil, M. 1994, Regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis Vinifera* L.) via Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of embryogenic calli, J. of Exp. Bot. 45 (274): 649-656.
- <237> Narayanaswamy, T.C., Ramaswamy, N.M., and Sree Rangaswamy, SR. 1995, Somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava, The Cassava Biotechnology Network. Proceeding of the Second International Scientific Meeting. Bogor, Indonesia, 22-26 August 1994, P:324-329.
- <238> Ng SYC (1992) Tissue culture of root and tuber crops at IITA. In: Thottappilly G, Monti LM, Mohan Rai DR, Moore AW (edz), Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa CTA/IITA co-publication, IITA, Ibadan, Nigeria, pp. 135-141.
- <239> Nzoghe, O. 1989. Recherche de conditions permettant l'obtention neoformations chez differents genotypes de manioc (*Manihot esculenta* Crantz), Extension a la culture de protoplastes. These. Universite De Paris Sud Centre D'Orsay, P: 119.
- <240> Ow, D.W., Wood, K.V., DeLuca, M., De Wet, JR., Helinski, DR., and Howell, S.H. 1986, Transient and Stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science 234: 856-859.

- <241> Potrykus, I., Saul, M., Paskowski, J., and -Shillito, R.D. 1985, Direct gene transfer into protoplasts of a graminaceous Mol. Gen. Genet., 199: 183-188.
- <242> Power, J.B., Bery, S.P., Chapman J. V., and Cocking, E.C. 1979. Somatic hybrids between unilateral cross-incompatible Petunia species. Theor. Appl. Genet. 55: 97-99.
- <243> Raemakers, C.J.J.Ivl. 1993, Primary and cyclic somatic embryogenesis in cassava *Manihot esculenta* Crantz. PhD thesis Agricultural University Wageningen, The Netherlands, P: 119.
- <244> Paemakers, C.J.J.M., Bessembinder, J., Staritsky, G., Jacobsen, E., and Visser, R.G.F. 1993a, Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33:151-156.
- <245> Raemakers, C.J.J.M., Arnati, M., Staritsky, G., Jacobsen, E., and Visser, R.G.F. 1993b, Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. Annals of Bot. 71: 289-294.
- <246> Raemkers, C.J.J.M., Schavemaker, C.M., Jacobsen, E., and Visser, R.G.F. 1993c, Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Plant Cell Rep. 12: 226-229.
- <247> Raemakers K, Schreuder, M, Muniykwa, T., Jacobsen & and & Visser P, 2000. Towards a routine transformation procedure for cassava. In: Cwvalho, L.J.C.B., Thro, A.M. and Vilarinhos A.D. (eds), Cassava biotechnology IV international scientific meeting-CBN, pp. 250-267. (ISBN85-87697-05-6), Brazilian Agricultural Research Cooperation-EMBRAPA, Brazil.
- <248> Raemakers K, Schreuder, M, Pereira, I., Muniykwa, T., Jacobsen E. and & Visser R., 2001. Progress made in FEC transformation of cassava. Euphytica (in press).
- <249> Rhodes, C.A., Pierce, D.A., Metler, I.J., Mascarenhas, D., and Detmer, J.J. 1988, Genetically transformed maize plants From protoplasts. Science 240:204-207.
- <250> Salehuzzaman S.N.I.M., Jacobsen, E and RGF Visser, 1993, Isolation and characterisation of a EDNA encoding granula-bound starch synthase from cassava ((*Manihot esculenta* Cvantz) and its antisense expression in potato. Plant Molecular Biology 23: 947-962.
- <251> Salehuzzaman S.N.I.M., Jacobsen, P, and RGF Visser, 1994, Expression patterns of two starch biosynthetic genes in *in Vitro* cultured cassava plants and their induction by Plant Science 98: 53-62.
- <252> Schenk R.U. & Hildebrandt A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany 50: 199-204.
- <253> Schreuder, M.M., Raemakers C.J.J.M., Jacobsen E, & Visser R.G.F. 2001, Efficient production of transgenic, plants by Agrobacterium-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). euphytica (in press).
- <254> Scorza, R., Cordts, J.M., Ramming, D.W., and Emershad, R.L. 1995, Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic Plants. Plant Cell Rep. 14: 589-592.
- <255> Shahin, E..A., and Shepard, J.F. 1980, Cassava mesophyll protoplasts: isolation, proliferation and shoot formation. Plant Science Letters 17: 459-465.
- <256> Shimamoto, K., Terada, P., Izama, T., and Fujimoto, H, 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. Nature 338: 274-276.
- <257> Sofiari, E, 1995, Regeneration and transformation in cassava *Manihot esculenta* Crantz. PhD thesis Agricultural University Wageningen, The Netherlands, P: 136.
- <258> Songstad, D.D., Somers, D.A., and Griesbach, R.J. 1995. Advances in alternative DNA delivery techniques. Plant Cell Tissue and Organ Culture 40: 1-15.
- <259> Stamp, J.A., and Henshaw, G.G, 1987a, Somatic embryogenesis from clonal leaf tissue of cassava.

Annals of Bot., 59: 445-450,

<260> Stamp, J.A. 1987. Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process, Annals of Bot. 59: 451-459, Stamp, J.A., and Hens-haw, G.G. 1987b, Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. Plant Cell Tissue and Organ Culture 10: 227-233.

<261> Stamp, J. A., and Henshaw, G.G. 1982, Somatic embryogenesis in cassava. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, 105: 183-187.

<262> Sudarmonowati and Bachtiar, 1995, Induction of somatic embryogenesig in Indonesian cassava genotypes. The Cassava Biotechnology Network. Proceeding of the Second International Scientific Meeting. Bogor, Indonesia, 22-26 August 1994. P: 364-374.

<263> Sudarmonowati, E., and G.G. Henshaw. 1992., The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cultivar usina picloram and dicamba. In: Roca, W.M., and Thro, A.M. (Eds). Proceedings First Scientifitc Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia 25-28 August 1992. PP: 128-133.

<264> Suhandano, S., Hughes. J., Brown, K., Sirju-Charan, G., Hughes, M., 2000, Chacterization of an elongation factor-I-alpha gene from cassava (*Manihot esculenta Crantz*): a new promoter for biotechnology. In: Carvalho, L.T.C.B., Thro, A.M, and Vilarinhos A.D. (eds). Cassava biotechnology IV international scientific meeting-CBN, pp. 572-581, (ISBN85-87697-05-6). Brazilian Agriculture Research Cooperation-FMBRAPA, Brazil.

<265> Szabados L., Hoyas P., and Roca W. 1987, *In vitro* somatic embryogonesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Rep. 6: 248-251.

<266> Taylor, N.J., Clarks, M., and Henshaw, G.G. 1992. The induction of -somatic ombryagenesis in fifteen African cassava cultivars, In: Roca, W.M., and Thro, A.M. (Ede). Proceedings First Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Cartagena, Colombia 25-28 August 1992, P; 134-137.

<267> Taylor, N.J., Edwards, M., and Henshaw, G.G. 1995, Production of friable embryogenic calli and suspension culture system in two genotypes of cassava. Second International Scientific Meeting of Cassava Biotechnology Network II. Bogor, Indonesia. P: 229-240.

<268> Taylor, N.J., Masona, M.V., Schopke C., Carcama, R., Ho, T., Gonzalez, A.E., Beaychy, R.N, and Fauquet, C., 2000, Production of genetically modified plants containing various genes of interest. in: Carvalho, L.J.C.B., Thro, A.M, and Vilarinhos A.D. (eds), Cassava biotechnology IV international scientific meeting-CBN, pp. 267-276. (ISBN85-87697-056), Brazilian Agricultural Research Cooperation-EMERAPA, Brazil.

<269> Thompson, J.C., Movva, N.R., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., and Botterman, J. 1987, Characte??ation of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*, The EMBO J.6 (9): 2319-2523.

<270> Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H., and Hinata, K. 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. Bio/technology, 6:1072-1074.

<271> Thro, AMT, Fregene, M., Raemakers CJM, Puonti Kaerias, J., Schopke C., Visser, R., Potrykus, I., Fauquet, C., Roca, W., Hershey, C., 1999. Genetic biotechnologies and cassava-based development. In: Hohn, T and Leisinger, K.M.(eds.). Biotechnology of food crops in developing countries. pp 141-185. Springer-Wien New York(ISBN3-211-83240-8).

<272> Visser RGF, Hergersberg M, van der Lay FR, Jacobsen E, Witbolt B, Feenstra WJ, 1989, Molecular cloning and partial chararterization of the gene for granula-bound starch synthase from a wild type and a amylose-free potato. Plant Sci. 64185-192.

<273> Visser RGF, Stolte A, Jacobsen E, 1991, Expression of a chimerc granula-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato tubers. Plant Physiol 82: 411-416.

- <274> Walker, P.M.B. 1989. Chambers Biology Dictionary. W&R Chamber Ltd. Clay Ltd, St. Ives Ptc. England. P:205.
- <275> Wolters, A.M.A., Schoenmakers, H.C.H., van der Meulen-Muiser, J.J.M., van der Knaap, E., Derkx, F.H.M., Koornneef, M., and Zelcer, A. 1991, Limited DNA station from the irradiated potato parent in fusion products of alino *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* Theor. Appl. Genet. 83: 225-232.
- <276> Wordragen M.F., and Dons, HINL 1992. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of recalcitrant crops. Plant Mol. Biol. Reporter 10: 12-36.
- <277> Woodward, B., and Puonti Kaerlas, 2001, Somatic embryogenesis from floral tissues of cassava(*Manihot esculenta* Crantz. Euphytica (in press).

발명의 효과

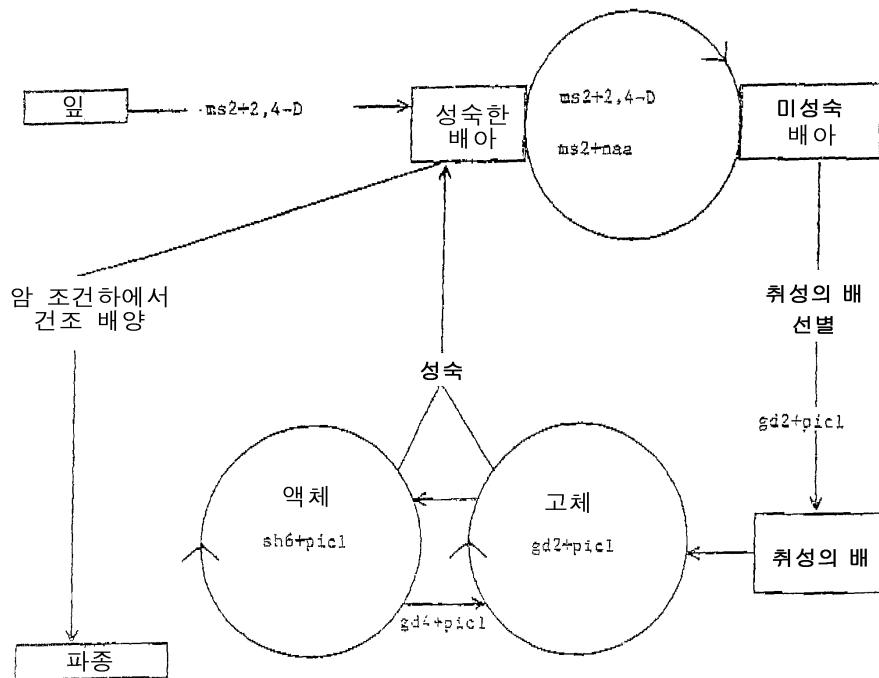
<278> 본 발명은 카사바 또는 밀접한 관련 종의 식물로 재생 가능한 원형질체를 제조하는 방법, 그리고 이러한 방법에 의해 얻어지는 원형질체 및 그 원형질체로부터 성장한 식물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

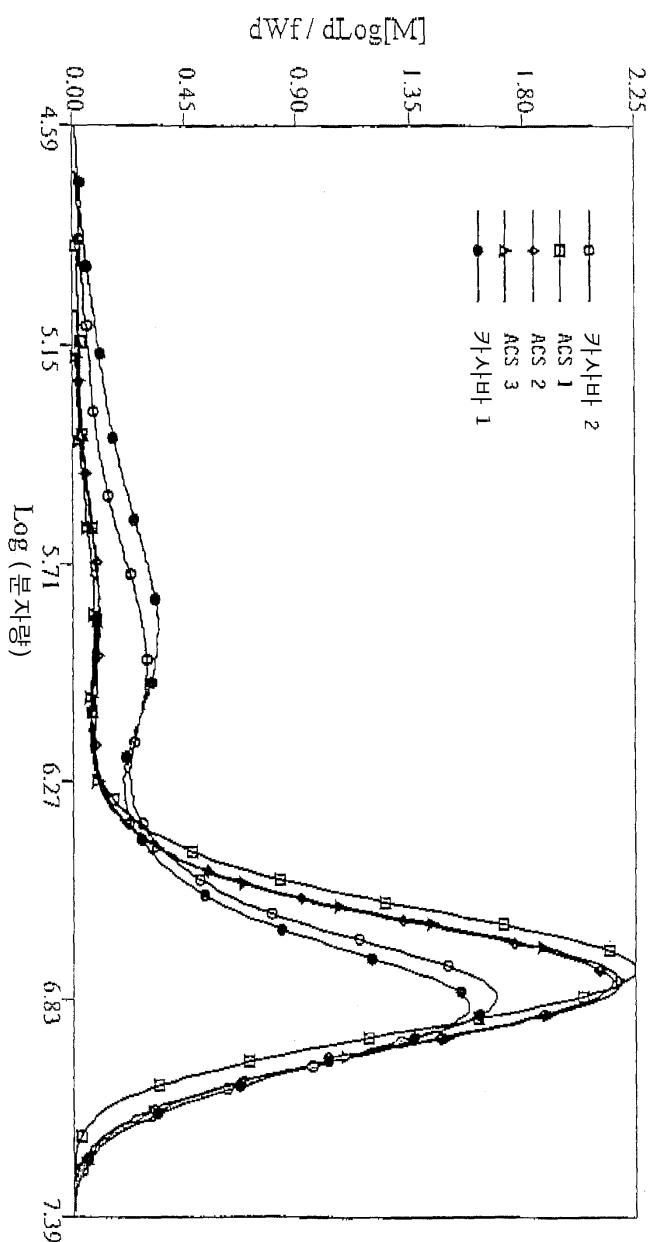
- <1> 도 1: 1차, 2차 체세포 배아발생, 축성의 배아발생 칼루스의 선별, 성숙 및 건조에 이어 발아를 포함하는 카사바에서의 체세포 배아발생 과정의 개요.
- <2> gd2 = Gresshoff 및 Doy(1974) 염 및 비타민과 20 g/ℓ 의 수크로오스가 강화된 배아지.
- <3> gd4 = Gresshoff 및 Doy(1974) 염 및 비타민과 40 g/ℓ 의 수크로오스가 강화된 배지.
- <4> ms2 = Murashige 및 Skoog 염 및 비타민과 20 g/ℓ 의 수크로오스가 강화된 배지.
- <5> pic = 10 mg/ℓ 의 Picloram, NAA = 10 mg/ℓ 의 나프탈렌 아세트산, 2,4-D = 8 mg/ℓ , 2,4-디클로로페녹시 아세트산.
- <6> sh6 = Schenk 및 Hildebrandt(1972) 염 및 비타민과 60 g/ℓ 의 수크로오스가 강화된 배지.
- <7> 도 2: 보통의 타피오카 전분 및 아밀로펙틴 타피오카 전분의 GPC에 의한 분자량 분포.
- <8> 도 3: 보통의 타피오카 전분 및 아밀로펙틴 타피오카 전분에 존재하는 가지 제거된 아밀로펙틴의 GPC에 의한 분자량 분포.
- <9> 도 4: 가지 제거된 보통의 타피오카 전분 및 아밀로펙틴 타피오카 전분의 GPC에 의한 분자량 분포.
- <10> 도 5: 보통의 타피오카 전분 및 아밀로펙틴 타피오카 전분의 Brabender 점도.

도면

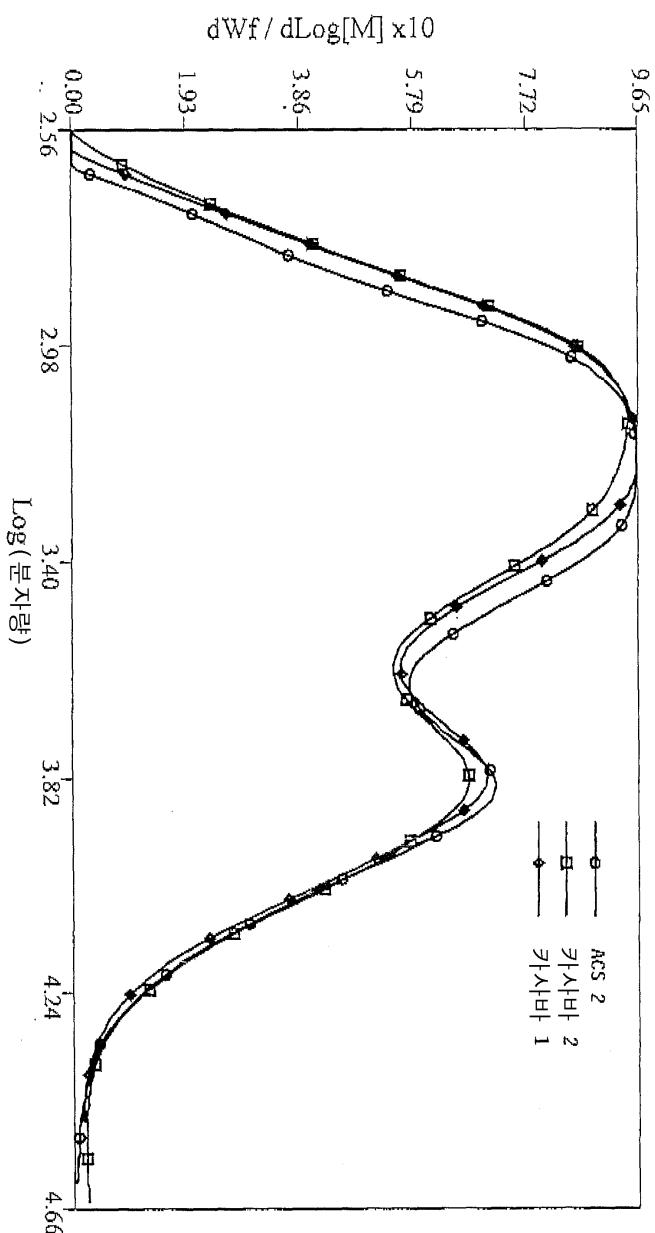
도면1



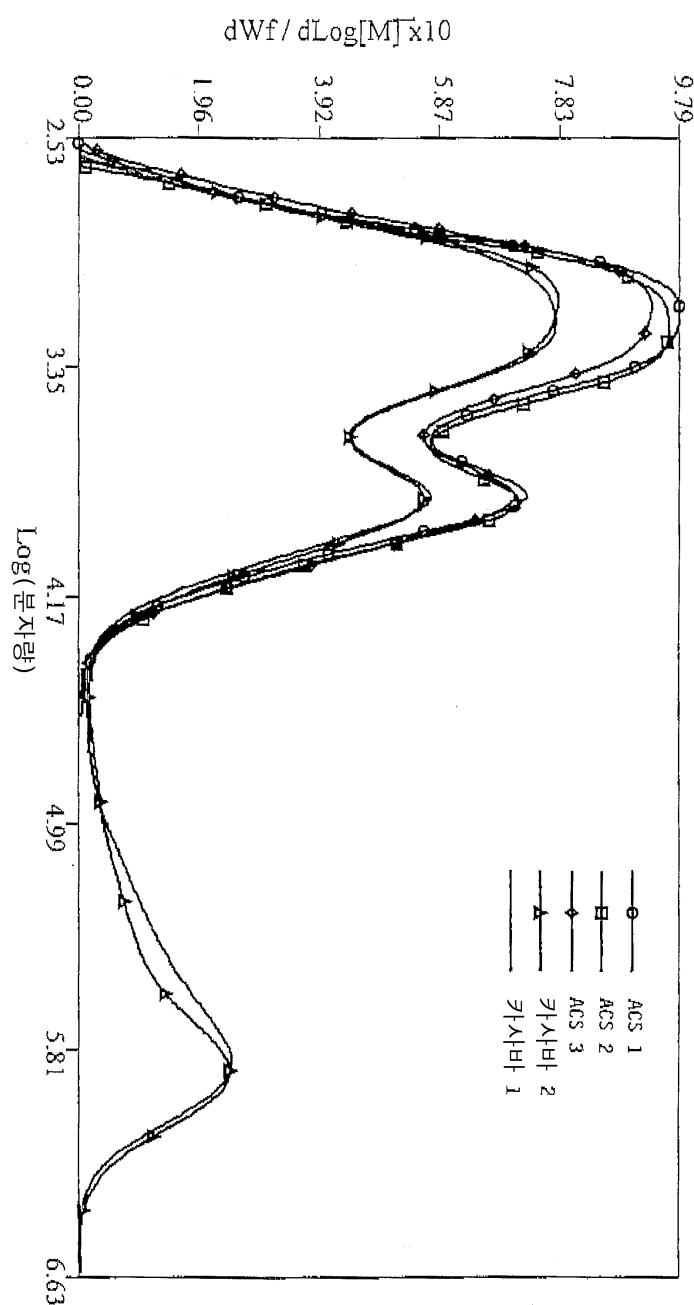
도면2



도면3



도면4



도면5

